

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Micro and nano particles useful e.g. as carriers of medicines, and agrochemicals, absorbents for cosmetic purposes, and for separations and analysis.

Patent number: DE19932216 **Also published as:**

Publication date: 2000-01-27

Inventor: ANDRY MARIE-CHRISTINE (FR); BUFFEVANT
CHANTAL (FR); REY-GOUTENOIRE SYLVIE (FR);
PARIOT NADINE (FR); PERRIER ERIC (FR);
EDWARDS FLORENCE (FR); LEVY MARIE-
CHRISTINE (FR)

Applicant: COLETICA LYON (FR)

Classification:

- **international:** C08B37/00; C08B37/16; B01J13/00; B01F3/08;
B01F17/00; A61K9/50; A61K9/52; A61K9/107;
A61K7/00; A61K47/36; A61K47/40; A61K47/42

- **european:** A61K8/11C, A61K8/35, A61K8/64, A61K8/73T,
A61K9/51, A61Q1/06, A61Q1/10, A61Q5/02,
A61Q19/09, B01J13/02

Application number: DE19991032216 19990709

Priority number(s): FR19980008809 19980709

Abstract of DE19932216

Particles comprise cell walls formed by the crosslinking of one or more mono- or oligosaccharides, using emulsion interfacial crosslinking, preferably at ambient temperature, of at least one primary alcohol group on the saccharide with a polyfunctional acylating agent, preferably a diacid halide (more preferably diacid chloride). Particles comprise cell walls formed by the crosslinking of one or more mono- or oligosaccharides, using emulsion interfacial crosslinking, preferably at ambient temperature, of at least one primary alcohol group on the saccharide with a polyfunctional acylating agent, preferably a diacid halide (more preferably diacid chloride). An Independent claim is also included for the preparation of the particles.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

THIS PAGE BLANK (USPTO)

02P18150



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 199 32 216 A 1

⑯ Int. Cl. 7:
C 08 B 37/00

C 08 B 37/16
B 01 J 13/00
B 01 F 3/08
B 01 F 17/00
A 61 K 9/50
A 61 K 9/52
A 61 K 9/107
A 61 K 7/00
A 61 K 47/36
A 61 K 47/40
A 61 K 47/42

⑯ Unionspriorität:
9808809 09.07.1998 FR

⑯ Anmelder:
Coletica, Lyon, FR

⑯ Vertreter:
Spott Weinmiller & Partner, 80336 München

⑯ Erfinder:
Perrier, Eric, Les Cotes d'Arey, FR; Rey-Goutenoire, Sylvie, Les Haies, FR; Buffevant, Chantal, Millery, FR; Levy, Marie-Christine, Reims, FR; Pariot, Nadine, Reims, FR; Edwards, Florence, Longueval, FR; Andry, Marie-Christine, Dizy, FR

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Teilchen, insbesondere Mikroteilchen oder Nanoteilchen, aus vernetzten Monosacchariden und Oligosacchariden, Verfahren zu deren Herstellung und kosmetische, pharmazeutische oder Nahrungsmittelzusammensetzungen, in denen sie vorhanden sind

⑯ Beschrieben werden Teilchen, die mindestens auf der Oberfläche eine Wand umfassen, die aus einem oder mehreren Monosacchariden oder Oligosacchariden gebildet ist, die durch Grenzflächenvernetzung in Emulsion, vorzugsweise bei Raumtemperatur, zwischen dem (den) Monosaccharid(en) oder Oligosaccharid(en) mit mindestens einer primären Alkoholgruppe und einem polyfunktionalen acylierenden Vernetzungsmittel, vorzugsweise einem Disäurehalogenid und insbesondere einem Disäurechlorid unter Bildung von Esterbindungen zwischen der (den) acylierbaren Hydroxylgruppe(n) des (der) primären Alkohols (Alkohole) des Monosaccharids oder Oligosaccharids und den Acylgruppen des polyfunktionalen Acylierungsmittels vernetzt sind. Diese Teilchen können zur Herstellung von kosmetischen, pharmazeutischen oder Nahrungsmittelzusammensetzungen verwendet werden.



DE 199 32 216 A 1

DE 199 32 216 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere Teilchen, speziell Mikroteilchen oder Nanoteilchen aus vernetzten Monosacchariden und Oligosacchariden, Verfahren zu deren Herstellung und kosmetische, pharmazeutische oder Nahrungsmittelzusammensetzungen, in denen sie vorhanden sind. Diese Teilchen besitzen vorzugsweise kleine Abmessungen. Darüber hinaus werden diese Teilchen vorzugsweise zu Einarbeitung oder Einkapselung verschiedener hydrophiler oder lipophiler Substanzen und insbesondere von Substanzen, die in pharmazeutischen, kosmetischen und Nahrungsmittelbereichen verwendet werden können, verwendet.

Im Rahmen der vorliegenden Beschreibung und der Ansprüche bezeichnet der Ausdruck "Teilchen kleiner Abmessungen" sowohl Mikroteilchen als auch Nanoteilchen. Die Ausdrücke "Mikroteilchen" oder "Nanoteilchen" bezeichnen sowohl Mikrokugeln oder Nanokugeln als auch Mikrokapseln oder Nanokapseln.

Des weiteren bezeichnen die Ausdrücke "Mikrokugeln" oder "Nanokugeln" Teilchen, die im wesentlichen eine gleichmäßige Struktur über ihre gesamte Masse hinweg aufweisen, während die Ausdrücke "Mikrokapseln" oder "Nanokapseln" Teilchen bezeichnen, die eine vernetzte Wand aufweisen, die einen inneren Kern oder Raum umgibt, der mit einem festen, gelierten, flüssigen oder gasförmigen Medium gefüllt ist.

Die Einkapselung von Wirkstoffen in Teilchen offeriert wertvolle Vorteile, beispielsweise den Schutz der eingekapselten Substanz oder ihre langsame Freisetzung an der Stelle der Verwendung während eines längeren Zeitraums.

Wenn die Teilchen zur Verwendung im kosmetischen, pharmazeutischen oder Nahrungsmittelbereich vorgesehen sind, müssen sie aus biokompatiblen Materialien, wie Proteinen und Polysacchariden, bestehen.

Die Herstellung von Mikrokapseln aus Polysacchariden, d. h. hochmolekularen Kohlenhydraten, wurde in der Literatur des Standes der Technik ausführlich beschrieben (vgl. beispielsweise P. B. Deasy: Microencapsulation and related processes, Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Band 20, 1984, Marcel Dekker).

Insbesondere können diese Verbindungen selbst in Mikroeingekapselungsverfahren auf der Basis einer einfachen Coacervation oder in Verbindung mit polykationischen Polymeren in Verfahren auf der Basis der Herstellung von Polyelektrolytkomplexen verwendet werden.

Mikrokapseln wurden ferner durch Grenzflächenvernetzung von Polysacchariden mit Hilfe von polyfunktionellen Isocyanaten hergestellt (vgl. beispielsweise die Beschreibung in der FR-A-2 275 250, die Mikrokapseln betrifft, die aus Hydroxypropylcellulose hergestellt wurden, oder die Beschreibung in der US-A-4 138 362, die natürliche Gummis oder Chitosan betrifft).

Darüber hinaus sind Mikrokapseln mit einer aus vernetzten Glykosaminoglykanen und Collagen gebildeten Wand in der FR-A-2 642 329 beschrieben, die die Anwendung einer Grenzflächenvernetzung unter Verwendung von Disäurechloriden bei Gemischen von Glykosaminoglykanen und Collagen betrifft.

Eine Grenzflächenvernetzung unter Verwendung von Disäurechloriden in Emulsionssystemen wurde ferner zur Herstellung von Teilchen aus Polysacchariden eingesetzt (vgl. EP-A-0 630 287), wobei die verwendeten Reaktions-pH-Werte 10 nicht überstiegen.

In diesen verschiedenen Verfahren zur Herstellung von Mikrokapseln waren die verwendeten Kohlenhydrate Polysaccharide, d. h. Moleküle mit hohen Molekulargewichten über 5000 Dalton, die aus einer Vereinigung einer großen Zahl von Osidinheiten bestehen. In der Tat ist es allgemein bekannt, daß Makromoleküle, wie Proteine und Polysaccharide, an den Grenzflächen spezielle Adsorptionseigenschaften aufweisen (vgl. beispielsweise S. 317 bis 335 des Werks: "Functional properties of food macromolecules", Herausgeber J. R. Mitchell und D. A. Lcdward, Elscvier, London, 1986). Diese Adsorptionsphänomene an Grenzflächen, die zur Bildung eines Grenzflächenfilms führen, sind ein besonders günstiger Faktor bei der Herstellung von Teilchen durch Grenzflächenvernetzung von Biopolymeren, wie Polysacchariden.

Bezüglich der Kohlenhydrate mit Molekulargewichten unter 5000 Dalton enthält die Literatur des Standes der Technik Verfahren zur Herstellung von Polymerperlen aus Cyclodextrinen, bei denen es sich um cyclische Oligosaccharide mit einem hydrophoben Hohlraum mit der Fähigkeit zum Einschluß verschiedener Moleküle verträglicher Geometrie handelt. Das am meisten verwendete Vernetzungsmittel ist Epichlorhydrin (vgl. beispielsweise den Artikel von N. Wiedenhof et al., Die Stärke, 1969, 21, 119-123).

Bezüglich der Verwendung von Säuredichloriden beschreibt die US-A-3 472 835 die Herstellung von Cyclodextrinharzen durch Vernetzung in einem homogenen Medium (DME oder DMSO). Die Herstellungsbedingungen sind jedoch drastisch, d. h. die Reaktion erfolgt bei 100°C während einer längeren Zeitspanne (6 h). Darüber hinaus diffundieren die einzuschließenden Substanzen nicht einfach in diese dichten Perlen hinein. Es wurden Vorschläge zur Verbesserung der Porosität der Polymere unterbreitet, entweder durch Erzeugen einer Freisetzung von CO₂ in situ (vgl. US-A-4 958 015) oder durch Durchführen der Vernetzung auf der Oberfläche eines porösen Mineraloxids (vgl. US-A-4 902 788). Die US-A-4 902 788 erklärt (S. 3, Sp. 3, Z. 54-55), daß der hauptsächliche Nachteil aromatischer Säuredichloride darin besteht, daß sie relativ geringe Harzausbeuten liefern.

Der Stand der Technik beschreibt somit weder die Herstellung von Teilchen durch Grenzflächenvernetzung von Monosacchariden oder Oligosacchariden, wie Cyclodextrinen, unter Verwendung von Säuredichloriden in Emulsionssystemen, noch legt er eine derartige Herstellung nahe.

Hauptaufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, biokompatible und bioabbaubare stabile Teilchen bereitzustellen, die optional verschiedene hydrophile oder lipophile Substanzen einschließen und die auf dem pharmazeutischen, kosmetischen und Nahrungsmittelgebiet verwendet werden können.

Eine weitere Hauptaufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, biokompatible und bioabbaubare Teilchen im Rahmen eines besonders einfachen Herstellungsverfahrens zur Herstellung von Teilchen konstanter Qualität, vorzugsweise aus Substanzen einer genau festgelegten chemischen Zusammensetzung bereitzustellen, die ferner in vorteilhafter Weise insbesondere in einer wässrigen Phase bei Raumtemperatur gelöst werden können.

Eine weitere Hauptaufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, neue biokompatible und bioabbaubare Teilchen kleiner Abmessungen aus Monosacchariden und Oligosacchariden bereitzustellen.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, eine Lösung für die Herstellung stabiler Teilchen kleiner Abmessungen aus Monosacchariden und Oligosacchariden anzugeben, wobei gleichzeitig gegebenenfalls eine Einkapselung einer oder mehrerer aktiver Substanzen in Form einer Lösung, Suspension oder Emulsion möglich ist.

Weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, eine Lösung zur Herstellung neuer biokompatibler und bioabbaubarer unlöslicher Teilchen kleiner Abmessungen aus Cyclodextrinen, insbesondere β -Cyclodextrinen anzugeben, die leicht aus einem flüssigen Medium isoliert werden können und die die spezifische Einschlußkapazität dieser Cyclodextrine beibehalten haben.

Weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, eine Lösung zur Herstellung neuer biokompatibler und bioabbaubarer poröser unlöslicher Teilchen kleiner Abmessungen aus Cyclodextrinen, insbesondere β -Cyclodextrinen, anzugeben, die in einfacher Weise mit verschiedenen aktiven Molekülen beladen werden können und anschließend in größere Teilchen eingebaut werden können, die auch biokompatibel und bioabbaubar sind, so daß eine langsamere und Langzeitfreisetzung des aktiven Moleküls durch Diffusion durch das Material des größeren Teilchens hindurch gewährleistet ist.

Weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, eine Lösung zur Herstellung eines Produkts aus Dihydroxyaceton (DHA) anzugeben; das bei Einbau in eine Zusammensetzung deren Stabilität, insbesondere deren Farbstabilität, nicht beeinträchtigt und das bei Applikation auf Haut DHA freisetzt, wobei das Dihydroxyaceton sich mit den Aminosäuren in der Haut unter Bildung einer Pigmentierung vereinigen kann.

Weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, einen beliebigen Abbau einer DHA enthaltenden Zusammensetzung, insbesondere eine beliebige Modifizierung ihrer Farbe über die Zeit hinweg zu verhindern.

Weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es eine Lösung zur Herstellung stabiler Teilchen kleiner Abmessungen aus Oligosacchariden oder Monosacchariden oder Polyolen oder Aminozuckern, die davon abgeleitet sind anzugeben, die die Ausgangsverbindung durch enzymatische Hydrolyse freisetzen können, wodurch ein spezieller Typ an Vorläufer mit der Fähigkeit zur langsamen Freisetzung einer Verbindung mit einer wertvollen biologischen Aktivität bereitgestellt wird.

Weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, eine Lösung zur Herstellung stabiler Teilchen kleiner Abmessungen aus Hetcrosiden, drcn Osidcinhcit ein oder mehrere Osidmolckülc enthält, anzugeben, die das Hetcrosid durch enzymatische Hydrolyse freisetzen können, so daß ein spezieller Typ von Vorläufer oder Prodrug bereitgestellt wird.

Weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die oben genannten neuen technischen Probleme mit Hilfe einfacher Herstellungsverfahren, die in industriellem Maßstab, insbesondere in der kosmetischen, pharmazeutischen oder Nahrungsmittelindustrie, verwendet werden können, zu lösen. Diese Lösung sollte es vorzugsweise ermöglichen, Teilchen kleiner Abmessungen herzustellen, deren Größe nach Belieben, insbesondere vom Nanometerbereich bis zu einem Bereich größer als Millimeter und insbesondere innerhalb eines Bereichs von etwa 10 nm bis etwa 2 mm eingestellt werden kann.

Eine weitere Hauptaufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, die oben genannten neuen technischen Probleme mit Ausgangsverbindungen zu lösen, die vollständig harmlos und billig sind, wodurch eine breite Verwendung in der pharmazeutischen, kosmetischen und Nahrungsmittelindustrie gewährleistet ist.

Gemäß der vorliegenden Erfindung wurde völlig unerwartet festgestellt, daß es möglich ist, stabile Teilchen, insbesondere Mikroteilchen oder Nanoteilchen aus Monosacchariden oder Oligosacchariden herzustellen, indem eine Grenzflächenvernetzungsreaktion zwischen einem Monosaccharid oder einem Oligosaccharid und einem polyfunktionellen acylierenden Vernetzungsmittel, insbesondere einem Disäurchalogenid und vorzugsweise einem Disäurchlorid an der Grenzfläche der Phasen einer Emulsion, insbesondere vom "Wasser-in-Öl"-Typ, vorzugsweise bei Raumtemperatur, eingeleitet wird.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform können diese Teilchen durch anfängliches Emulgieren einer wässrigen Alkaliphase, die das Monosaccharid oder Oligosaccharid in einer hydrophoben Phase enthält, vorzugsweise bei Raumtemperatur, und anschließendes Zugeben der Lösung des Vernetzungsmittels zu der Emulsion hergestellt werden. Es wurde ferner festgestellt, daß aus vernetzten Molekülen des Kohlenhydrats bestehende Membranen an der Grenzfläche der wässrigen Tröpfchen infolge der Erzeugung von Esterbindungen zwischen dem Vernetzungsmittel und den Hydroxygruppen des Monosaccharids oder Oligosaccharids gebildet werden.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht ferner die Herstellung von Teilchen großen Werts durch Grenzflächenvernetzung von Monosacchariden und Oligosacchariden unter Verwendung von difunktionellen Acylierungsmitteln in Emulsionssystemen, vorzugsweise bei Raumtemperatur. In der Tat sind Monosaccharide und Oligosaccharide Substanzen genau definierter chemischer Zusammensetzung und somit konstanter Qualität, die anders als hochmolekulare Polysaccharide kein Risiko einer Schwankung der Zusammensetzung zwischen Herstellern oder zwischen Produktchargen eröffnen. Des Weiteren sind Monosaccharide, wie Glucos, und Oligosaccharide, wie Lactose oder Saccharose, anders als Polysaccharide, die häufig nicht bereitwillig in in diesen Verfahren einsetzbaren wässrigen Phasen löslich sind und häufig ein Erwärmen der wässrigen Phase, um ein Auflösen zu erreichen, erfordern, in Wasser bei Raumtemperatur gut löslich. Darüber hinaus ist anzumerken, daß zahlreiche dieser Verbindungen, wie Saccharose oder Lactose, in breitem Rahmen in der Nahrungsmittelindustrie verwendet werden und zu relativ niedrigen Kosten erhältlich sind. Ferner sind diese Verbindungen vollständig harmlos.

Es scheint folglich, daß sie im allgemeinen fähig sind, biokompatible und bioabbaubare Teilchen zu liefern, die verschiedene hydrophile oder lipophile Substanzen einschließen, die in der pharmazeutischen, kosmetischen oder Nahrungsmittelindustrie verwendet können.

Des Weiteren kann die Grenzflächenvernetzung einiger dieser Verbindungen es ermöglichen, daß die folgenden speziellen Aufgaben gelöst werden:

- Die Stabilisierung einer abbaubaren Substanz wie im Falle von Dihydroxyacetron (DHA), wodurch farbige Abbauprodukte über die Zeit hinweg geliefert werden,
- und/oder die Herstellung eines Vorläufers in Teilchenform mit der Fähigkeit zur Freisetzung einer aktiven Form

nach enzymatischem Angriff, beispielsweise von:

- DHA mit der Fähigkeit zur Vereinigung mit den Aminosäuren in der Haut, wobei der Haut eine Pigmentierung verliehen wird,
- oder einem Heterosid, beispielsweise einem Saponosid oder Streptomycin, in einem Fall, in dem die Osidseinheit des Heterosids, das aus einem oder mehreren Osidmolekülen mit mindestens einer primären Alkoholgruppe besteht, es ermöglicht hat, Teilchen durch Grenzflächenvernetzung herzustellen.

Es ist darauf hinzuweisen, daß das Prinzip der Estervorläufer von aktiven Molekülen im Rahmen einer Therapeutik bezüglich Arzneimitteln, die zur Applikation auf die Haut vorgesehen sind (K. H. Viala et al., Drug Dev. Ind. Pharm., 1985, 11, 1133–1173) oder in der Kosmetik (J. P. Forestier, Int. J. Cosmetic Sci., 1992, 14, 47–63) entwickelt wurde.

- oder die Herstellung von porösen unlöslichen Teilchen aus Cyclodextrinen, die spezielle Anwendungen auf der Basis des Einschlusses von Molekülen zur Entfernung derselben aus einem flüssigen Medium, zum Ernten derselben oder zum Freisetzen des eingeschlossenen Molekuls in langsamer Weise an der Wirkstelle eröffnen.

Wenn die in den Dokumenten des Standes der Technik, beispielsweise in der EP-A-0 630 287, beschriebenen Bedingungen, die für Polysaccharide gelten, nun auf Monosaccharide oder Oligosaccharide angewendet werden, d. h. wenn die Grenzflächenvernetzung mit Säuredichloriden in Emulsionssystemen durchgeführt wird, in denen der pH-Wert der zur Auflösung der Kohlenhydrate verwendeten wäßrigen Phase 9,8 nicht übersteigt, ist es nicht möglich, stabile Teilchen zu erhalten. Man erhält 0% Ausbeute oder lediglich eine sehr geringe Ausbeute der Teilchen, wobei eine mikroskopische Untersuchung zahlreiche Bruchstücke zeigt. Dies deutet auf die hohe Brüchigkeit des vernetzten Materials hin.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde vollständig unerwartet festgestellt, daß es möglich ist, stabile Teilchen, insbesondere Mikroteilchen oder Nanoteilchen, aus vernetzten Oligosacchariden oder Monosacchariden unter Verwendung einer wäßrigen alkalischen Phase mit einem pH-Wert größer 10 zur Auflösung der Kohlenhydrate und durch Starten der Polykondensationsreaktion unter Verwendung eines Dihalogenids, insbesondere eines Säuredichlorids, an der Grenzfläche einer Emulsion herzustellen.

Die erhaltenen Teilchen sind ausreichend stabil, um einer längeren Inkubation in einem Ofen bei 45°C in Form einer wäßrigen Suspension ohne Zerstörung ihrer Struktur zu widerstehen. Sie sind ferner ausreichend stabil, um einer Lyophilisierung unterzogen zu werden, ohne daß ihre Struktur zerstört wird und nehmen nach Rehydratisierung wieder eine kugelförmige Form an. Dies stellt einen weiteren entscheidenden technischen Vorteil der vorliegenden Erfindung dar.

Die Teilchen werden nach und nach nach Inkubation in Humanplasma zerstört. Dies zeigt ihre Bioabbaubarkeit insbesondere unter der Einwirkung von Esterasen.

In Abhängigkeit von den gewählten Emulgierbedingungen kann die Teilchengröße von weniger als 1 µm, d. h. von einer Nanometergröße, die beispielsweise durch Verwendung eines Hochdruckhomogenisators erreicht wird, bis zu mehreren Hundert µm und sogar bis zu mehr als 1 mm schwanken.

Es wurde ferner festgestellt, daß es möglich ist, durch Einleiten der Polykondensationsreaktion in einer Emulsion vom "Öl-in-Wasser"-Typ Teilchen zu erhalten. In diesem Fall wird eine hydrophobe Phase, die ein Vernetzungsmittel vorzugsweise ein Disäurehalogenid, und insbesondere ein Disäurechlorid enthält, in einer als kontinuierliche Phase verwendeten wäßrigen Alkaliphase, die das Monosaccharid oder Oligosaccharid enthält, emulgiert. Die Reaktion läßt man an der Grenzfläche sich entwickeln, wobei ein Rührn eine geeignete Zeit lang aufrecht erhalten wird. Es wurde festgestellt, daß sich um die dispergierten hydrophoben Tröpfchen eine Membran bildet, die Teilchen mit hydrophobem Inhalt liefert, die in diesem Fall aus Kapseln bestehen.

Gemäß einem ersten Merkmal umfaßt die vorliegende Erfindung Teilchen, die mindestens auf der Oberfläche eine Wand umfassen, die aus einem oder mehreren Monosacchariden oder Oligosacchariden gebildet wurde die durch Grenzflächenvernetzung in Emulsion, vorzugsweise bei Raumtemperatur zwischen (einem) Monosaccharid (Monosacchariden) oder Oligosaccharid (Oligosacchariden) mit mindestens einer primären Alkoholgruppe und einem polyfunktionellen acylierenden Vernetzungsmittel, vorzugsweise einem Disäurehalogenid und insbesondere einem Disäurechlorid unter Bildung von Esterbindungen zwischen der (den) acylierbaren Hydroxylgruppe(n) des (der) primären Alkohols (Alkohole) des Monosaccharids oder Oligosaccharids und den Acylgruppen des polyfunktionellen Acylierungsmittels vernetzt sind.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann jedes beliebige Monosaccharid oder Oligosaccharid mit einem Molekulargewicht unter 5000 Dalton, das mindestens eine primäre Alkoholgruppe trägt, ohne Einschränkung verwendet werden. In ähnlicher Weise kann jedes beliebige polyfunktionelle Vernetzungsmittel, das mindestens zwei acylierende Gruppen enthält, ohne Einschränkung verwendet werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist es möglich, Monosaccharid- oder Oligosaccharidderivate, beispielsweise Polyole aus der Hydrierung von Aldehyd- oder Ketongruppen von Osen, Aldonsäuren, die von Aldosen abgeleitet sind, und entsprechende Lactone, Phosphorsäureester von Osen, Osamine oder Heteroside, deren Osidseinheit aus einer oder mehreren Osen besteht und die mindestens eine primäre Alkoholgruppe enthält, zu verwenden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können die oben genannten Teilchen aus einem einzelnen niedrigmolekularen Monosaccharid oder Oligosaccharid oder aus Gemischen hergestellt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können die oben genannten Monosaccharide Ketosen, beispielsweise Dihydroxyacetone (DHA), Erythrulose, Ribulose, Xylulose, Fructose und Sorbose, sowie Derivate hiervon sein.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können die oben genannten Monosaccharide Aldosen, beispielsweise Erythrose, Threose, Xylose, Arabinose, Ribose, Desoxyribose, Glucose, Mannose und Galactose sowie Derivate hiervon sein.

Die selbst oder in Gemischen in den erfundungsgemäßigen Verfahren verwendbaren Monosacchariddervate umfassen

insbesondere die entsprechenden Polyole, wie Sorbit, Mannit, Xylit, Arabit, Dulcit, Lactit, Galactit, Erythrit und Threit, Aminozucker, wie Glucosamin, Galactosamin, Glucosaminsulfat und Galactosaminsulfat, sowie Aldonsäuren oder Lactone, wie Gluconsäure, Galactonsäure, Gluconolacton und Galactonolacton. Im Handel erhältliche, Polyole enthaltende Zubereitungen, beispielsweise Neosorb 70° (70% Sorbit, Roquette), gehören auch zu dieser Gruppe.

Die selbst oder in Gemischen in den erfundungsgemäßen Verfahren verwendbaren Oligosaccharide umfassen Disaccharide, insbesondere Saccharose, Lactose, Maltose, Cellulose, Trehalose und Melibiose, Oligosaccharide, wie Raffinose, Dextrine oder Produkte der teilweisen Hydrolyse von Stärke, Cyclodextrine, wie alpha-Cyclodextrin, beta-Cyclodextrin und gamma-Cyclodextrin, Cyclodextrinderivate, wie Hydroxyethyl- β -cyclodextrin und Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (2-HP- β -CD, 3-HP- β -CD, 2,3-HP- β -CD), verzweigte Cyclodextrine, wie Glukosyl- β -CD, Diglukosyl- β -CD, Maltosyl- β -CD und Dimaltosyl- β -CD oder Gemische von Oligosacchariden, beispielsweise die unter der Bezeichnung Glucidex® von Roquette auf dem Markt erhältlichen Produkte, die wechselnde Anteile an Glucose, Maltose und Maltodextrinen enthalten.

Die selbst oder in Gemischen in den erfundungsgemäßen Verfahren verwendbaren Oligosacchariderivate umfassen insbesondere die entsprechenden Polyole, wie Maltit und Lactit oder im Handel erhältliche, Polyole enthaltende und durch Hydrieren von Produkten der teilweisen Hydrolyse von Stärke erhaltene Zubereitungen.

Die Monosaccharid- und Oligosacchariderivate umfassen ferner Heteroside oder Glykoside, d. h. Moleküle aus einer an eine Nichtosideinheit gebundenen Osideinheit. Die in den erfundungsgemäßen Verfahren verwendbaren Heteroside besitzen eine Osideinheit, die eine oder mehrere Osideinheiten und mindestens eine primäre Alkoholgruppe enthält. Die Nichtosid- oder Aglykonfraktion besitzt vorzugsweise eine cyclische Struktur mit einem oder mehreren aromatischen oder nichtaromatischen Ringen, die ein oder mehrere Heteroatome, wie Stickstoff-, Sauerstoff- oder Schwefelatome umfassen können.

Die in den erfundungsgemäßen Verfahren verwendbaren Heteroside umfassen insbesondere β -D-Xyloside, beispielsweise 4-Methylumbelliferyl- β -D-xylosid und para-Nitrophenyl- β -D-xylosid, Riboflavin, natürliche Nucleoside aus Ribonucleosiden, wie Guanosin, Adenosin, Uridin und Cytidin, oder Desoxyribonucleosiden, wie Desoxyguanosin, Desoxyadenosin, Desoxycytidin und Thymidin, synthetische antivirale oder Antikrebsnucleoside, Strukturanaloge von natürlichen Nucleosiden, wie Adenosinanaloge und Desoxycytidinanaloge, Mononucleotide, Desoxymononucleotide, Oligonucleotide, Desoxyoligonucleotide, Antibiotika der Aminoglykosidgruppe, wie Streptomycin, Dihydrostreptomycin, Kanamycin, Amikacin, Dibekacin, Tobramycin, Neomycin und Paromomycin, Saponoside mit steroidalem Aglykon, beispielsweise Saponoside aus Efeu, Saponoside mit Triterpenaglykon, wie das Saponosid aus der Panamarinde, oder kardiotonische Heteroside mit steroidalem Aglykon, wie Digitoxin.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfaßt die vorliegende Erfindung ferner Teilchen, die mindestens auf der Oberfläche eine aus Cyclodextrinen, insbesondere vernetzten β -Cyclodextrinen gebildete Wand umfassen.

Die Erfinder haben in besonders unerwarteter Weise festgestellt, daß die aus Cyclodextrinen hergestellten Teilchen eine wertvolle Einschlußfähigkeit beibehalten, in einfacher Weise aus den die einzuschließende Substanz enthaltenden Medien abgetrennt werden können und nach Abgabe der eingeschlossenen Substanz wiederverwendet werden können. Wenn es deshalb erwünscht ist, einen Bestandteil eines Gemisches durch Komplexierung zu entfernen, ermöglicht es die Verwendung dieser unlöslichen Form in einfacher Weise, den Komplex abzutrennen und sogar das komplexierte Molekül aus der unlöslichen Form von Cyclodextrin zu entfernen, so daß es wiederverwendet werden kann.

So können in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die Teilchen der vernetzten Cyclodextrine gemäß der vorliegenden Erfindung mit einer aktiven Substanz, insbesondere einer kosmetisch aktiven Substanz, einer pharmazeutisch aktiven Substanz, einer diätetisch aktiven Substanz, einer Agrarahrungsmittelsubstanz oder einer agroindustriellen Substanz getränkt oder beladen werden. Das Durchtränken oder Beladen mit der aktiven Substanz oder dem aktiven Wirkstoff kann in sehr einfacher Weise erfolgen. Beispielsweise werden die Teilchen der vernetzten Cyclodextrine in eine Lösung, die den aktiven Wirkstoff enthält, während einer ausreichenden Zeit eingetaucht oder darin inkubiert, so daß eine Durchtränkung oder Beladung mit den Teilchen oder ein Einschluß zumindestens einer der aktiven Wirkstoffteilchen erfolgt. Der pH-Wert der wäßrigen Lösung des aktiven Wirkstoffs liegt nahe der Neutralität oder ist schwach sauer und darf 8 nicht übersteigen, d. h. er liegt vorzugsweise zwischen etwa 4,5 und 8, um eine Hydrolyse der Esterbindungen und ein Abbau der Teilchen zu vermeiden.

Dieses Durchtränken oder Beladen mit aktiven Substanzen oder aktiven Wirkstoffen liefert ein System, das langsam diese aktive Substanz oder diesen aktiven Wirkstoff aus dem System freisetzt.

Diese langsame oder verzögerte Freisetzung kann in folgender Weise weiter verbessert werden.

So können in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die Teilchen der vernetzten Cyclodextrine gemäß der vorliegenden Erfindung, die mit dem aktiven Wirkstoff beladen sind, in größeren Teilchen, die aus einem vernetzten Protein oder einem Gemisch aus covernetzten Proteinen und Polysacchariden gebildet sind, unter Bildung eines für eine langsame Freisetzung sorgenden Systems eingeschlossen werden. In diesem Fall werden diese Teilchen durch anfängliches Herstellen der Teilchen der vernetzten Cyclodextrine gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellt. Diese Teilchen werden anschließend in einer Lösung des aktiven Wirkstoffs während einer ausreichenden Zeit inkubiert, so daß einige der aktiven Wirkstoffteilchen in den Teilchen eingeschlossen werden, wie dies oben gerade für den Einschluß oder die Beladung mit aktiver Substanz oder aktivem Wirkstoff in die bzw. der Teilchen der vernetzten Cyclodextrine beschrieben wurde.

Proteine oder ein Gemisch aus Protein und Polysaccharid werden anschließend in der Suspension der vernetzten Teilchen gelöst, worauf das erhaltene Gemisch als wäßrige Phase zur Herstellung von Teilchen durch Grenzflächenvernetzung des Proteins oder Protein/Polysaccharid-Gemisches in einer Emulsion vom Wasser-in-Öl-Typ unter Verwendung eines Säuredihalogenids, vorzugsweise eines -dichlorids, gemäß den früheren Patenten der Anmelder der vorliegenden Erfindung, beispielsweise der US-A-5 359 620 oder der FR-A-97 08968 verwendet wird. Das Gemisch wird anschließend in einer hydrophoben Phase unter Bildung einer Emulsion dispergiert, worauf ein Säuredihalogenid, vorzugsweise ein -dichlorid zu der Emulsion zugesetzt wird und die Reaktion eine ausreichende Zeit ablaufen gelassen wird, so daß

sich um die Teilchen der zuvor vernetzten Cyclodextrine gemäß der vorliegenden Erfindung durch Acylierung der acylierbaren funktionellen Gruppen des Proteins oder Protein/Polysaccharid-Gemisches größere Teilchen bilden. Dies liefert letztendlich größere Teilchen, die die intakten Teilchen der vernetzten Cyclodextrine gemäß der vorliegenden Erfindung und aktiven Wirkstoff, der teilweise durch Teilchen der vernetzten Cyclodextrine komplexiert ist, enthalten. Das die größeren Teilchen bildende vernetzte Material gewährleistet eine langsame Freisetzung des aktiven Wirkstoffs aus dem System.

Als im Rahmen der vorliegenden Erfindung in vorteilhafter Weise verwendbare Proteine lassen sich tierische Proteine, wie Collagen, Atelocollagen, Gelatine, Serumalbumin, Ovalbumin, Hämoglobin, Milchproteine, einschließlich Casein und Molkenproteine, Lactalbumin, Globuline und Fibrinogen, sowie pflanzliche Proteine, die insbesondere aus Leguminosen und insbesondere aus den folgenden Pflanzen: Sojabohnen, Lupinen, Erbsen, Kichererbsen, Lucerne, Pferdebohnen, Linsen, Gartenbohnen, Raps und Sonnenblumen, oder aus den folgenden Getreidesorten: wie Weizen, Mais, Gerste, Malz, Hafer und Roggen, extrahiert sind. Als bevorzugt verwendbare Polysaccharide lassen sich Glykosaminoglykane, in vorteilhafter Weise einschließlich Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat Dermatansulfat, Heparansulfat und Keratansulfat, sowie Heparin und Derivate hiervon, insbesondere niedrigmolekulares Heparin mit einem Molekulargewicht zwischen etwa 2000 und 10.000, sowie kosmetisch oder pharmazeutisch akzeptable Heparinsalze, wie Dinatrium- und Calciumsalze, natürliche Gummis, Carrageensorten, Glucomannane, Galactomannane, Amylose oder Amylopektin oder Gemische hiervon sowie hydroxyalkylierte Polysaccharidderivate, wie Hydroxyethylstärke oder Hydroxyethylcellulose, nennen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfaßt die vorliegende Erfindung auch Teilchen, die mindestens auf der Oberfläche eine Wand umfassen, die aus vernetzten Cyclodextrinen, insbesondere β -Cyclodextrinen, gebildet ist, wobei die Teilchen mit einer aktiven Substanz beladen sind und in größeren biokompatiblen und bioabbaubaren Teilchen, beispielsweise Teilchen aus vernetzten Proteinen oder covernetzten Proteinen und Polysacchariden unter Bildung eines für eine langsame Freisetzung sorgenden Systems eingeschlossen sind.

Zur Herstellung dieser Teilchen wird in diesem Fall ein Protein gegebenenfalls zusammen mit einem Polysaccharid zu einer Suspension aus Cyclodextrinteilchen in der Lösung der aktiven Substanz zugegeben, worauf diese wässrige Phase zur Herstellung von Teilchen durch Grenzflächenvernetzung gemäß der früheren Patente der vorliegenden Anmelder, beispielsweise gemäß US-5 395 620 oder FR-A-97 08968 verwendet wird.

Es ist bekannt, daß Cyclodextrine cyclische Oligosaccharide aus 6 bis 8 Glucoseenheiten sind. Diese Moleküle besitzen wertvolle Eigenschaften in Verbindung mit der Hydrophobie ihrer internen Hohlräume. Insbesondere können sie die Löslichkeit der aktiven Wirkstoffe erhöhen (dies gilt insbesondere für β -Cyclodextrine und hydrophile Derivate hiervon) und verschiedene Moleküle einschießen und somit diese gegenüber Wärme, Oxidation, Licht und Verdampfung stabilisieren (Beispiele hierfür sind essentielle Öle, Geschmacksstoffe und lipolösliche Vitamine).

Des weiteren sorgen einige Cyclodextrinderivate für eine Langzeitfreisetzung oder verzögerte Freisetzung des eingeschlossenen Moleküls (K. Uekama et al. in: New Trends in Cyclodextrins and Derivatives, Herausgeber D. Duchêne, Editions de Santé, Paris, 1991, Kap. 12, S. 411-446). Dies gilt insbesondere bei hydrophoben β -Cyclodextrinderivaten, wie Diethyl- und Triethyl- β -cyclodextrinen, die die Wasserlöslichkeit der stark wasserlöslichen aktiven Wirkstoffe verringern (langanhaltende Freisetzung) oder für ionisierbare β -Cyclodextrinderivate, wie Carboxymethylethyl- β -cyclodextrin, eine Verbindung, die in sauren Medien gering löslich ist und deren Löslichkeit mit dem pH-Wert durch Ionisation der Carboxymethylgruppe ansteigt (eine Freisetzung im Magenraum wird verhindert und verzögert, bis der Darm erreicht ist).

Diese Derivate sind jedoch relativ teuer, verglichen mit den anfänglichen Cyclodextrinen. Was die anfänglichen Cyclodextrine anbelangt, stellt ihre Löslichkeit in Wasser ein Problem dar, wenn es gewünscht ist, sie in einem Freisetzungssystem zu verwenden, das mit Wasser in Berührung gebracht werden soll, da diese Löslichkeit eine Steuerung der Freisetzung des komplexierten Moleküls schwierig macht (R. B. Friedman in: New Trends in Cyclodextrins and Derivates, Herausgeber D. Duchêne, Editions de Santé, Paris, 1991, Kap. 4, S. 157-177). In ähnlicher Weise hemmt die Löslichkeit in Wasser die Isolierung der Komplexe, wenn es speziell gewünscht ist, einen Bestandteil aus einem Gemisch in einem wässrigen Medium zu entfernen, und die Gewinnung der freien Cyclodextrine, wenn es gewünscht ist, sie in kommerziellem Maßstab zu recyceln.

Die Herstellung der Cyclodextrine enthaltenden Polymere liefert eine Lösung für diese Probleme. Eine langsamere Freisetzung einer aktiven Substanz kann somit durch Komplexieren derselben an ein β -Cyclodextrin tragendes Polymer und durch Anordnen einer Dialysemembran zwischen dem Polymer und dem Freisetzungsmedium erreicht werden. Beispielsweise zeigen N. Behar et al. (S.T.P. Pharma, 1987, 3, 237-247), daß das Einbringen von synthetischen Polymeren, wobei eines wasserlöslich (Polyethylenimin) und das andere wasserunlöslich (hergestellt aus Polyvinylchlorformiat) ist, die Cyclodextrinmoleküle tragen und mit einer sehr wasserlöslichen aktiven Substanz, wie Propanolol, beladen sind, in ein Dialyserohr es ermöglicht, die Diffusion des aktiven Wirkstoffs in die äußere wässrige Kammer zu verlangsamen, wobei das Polymer und der Komplex nicht in der Lage sind, durch die Membran hindurchzutreten.

In unerwarteter Weise konnten die Erfinder der vorliegenden Erfindung in mit Propanolol in Gegenwart von vollständig biokompatiblen und bioabbaubaren Teilchen vernetzter Cyclodextrine gemäß der vorliegenden Erfindung durchgeführten Dialyseexperimenten dasselbe Phänomen beobachten.

Gemäß demselben Prinzip berichtet E. Fenyvesi (J. Inclusion Phenom., 1988, 6, 537-545) daß ein aus Mikrokapseln, die einen aktiven Wirkstoff, der mit einem löslichen Cyclodextrinpolymer komplexiert ist, enthalten, bestehendes System die Verzögerung der Freisetzung des aktiven Wirkstoffs ermöglicht, wobei das Polymer nicht in der Lage ist, durch die Membran der Mikrokapsel hindurchzutreten.

Die Erfinder der vorliegenden Erfindung konnten dieses bemerkenswerte Ergebnis auch mit vollständig biokompatiblen Mikrokapseln aus vernetztem Protein, die Methylenblau enthalten, das mit zunehmenden Mengen an Teilchen aus vernetzten β -Cyclodextrinen komplexiert ist, erhalten. In-vitro-Freisetzungsexperimente zeigen eine Verlangsamung der Freisetzung verglichen mit Mikrokapseln, die keine Cyclodextrinteilchen enthalten. Die Verlangsamung wird noch ausgeprägter, wenn die Mengen an eingekapselten Cyclodextrinteilchen zunimmt.

DE 199 32 216 A 1

Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben ferner festgestellt, daß Teilchen aus vernetztem DHA vollständig stabil sind, während gleichzeitig eine Pigmentierung nach Applikation auf die Haut auftritt. Dies zeigt, daß sie biologisch abbaubar sind und die Basesubstanz zu regenerieren vermögen, wobei die spezifische Aktivität nach enzymatischem Abbau intakt bleibt.

Gemäß einem zweiten Merkmal liefert die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Teilchen kleiner Abmessungen, die mindestens auf der Oberfläche eine aus einem oder mehreren vernetzten Monosacchariden oder Oligosacchariden gebildete Wand umfassen, wobei das Verfahren die folgenden Stufen umfaßt:

- a) die Herstellung einer wäßrigen Phase bei einem pH-Wert zwischen 10,5 und etwa 14, worin mindestens ein Monosaccharid oder mindestens ein Oligosaccharid gelöst ist;
- b) die Herstellung einer hydrophoben Phase, die im wesentlichen mit Wasser nicht mischbar ist und die gegebenenfalls ein grenzflächenaktives Mittel enthält;
- c) die Dispersion der wäßrigen Phase in der hydrophoben Phase durch Rühren, um eine Emulsion vom Wasser-in-Öl-Typ herzustellen;
- d) die Zugabe einer Lösung eines polyfunktionellen Acylierungsmittels zu der Emulsion, wobei das Rühren eine ausreichende Zeidauer fortgesetzt wird, um das Monosaccharid oder Oligosaccharid an der Grenzfläche der dispersierten Tröpfchen der Emulsion zu vernetzen, und um dadurch Teilchen zu bilden; und
- e) gegebenenfalls die Abtrennung der Teilchen von dem Reaktionsmedium.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Teilchen kleiner Abmessungen, die mindestens auf der Oberfläche eine aus einem oder mehreren vernetzten Monosacchariden oder Oligosacchariden gebildete Wand umfassen, wobei das Verfahren die folgenden Stufen umfaßt:

- a) die Herstellung einer wäßrigen Phase bei einem pH-Wert zwischen 10,5 und etwa 14, worin mindestens ein Monosaccharid oder mindestens ein Oligosaccharid gelöst ist;
- b) die Herstellung einer hydrophoben Phase, die im wesentlichen mit Wasser nicht mischbar ist und die ein polyfunktionelles acylierendes Vernetzungsmittel enthält;
- c) die Dispersion der hydrophoben Phase in der wäßrigen Phase durch Rühren unter Herstellung einer Emulsion vom Öl-in-Wasser-Typ, wobei das Rühren eine ausreichende Zeidauer durchgeführt wird, um das Monosaccharid oder Oligosaccharid an der Grenzfläche der dispersierten Tropfen der Emulsion zu vernetzen und um dadurch Teilchen, im wesentlichen Kapseln, herzustellen; und
- d) gegebenenfalls die Abtrennung der Teilchen aus dem Reaktionsmedium.

Die vorliegende Erfindung liefert ferner ein Verfahren zur Herstellung von Teilchen aus vernetzten Cyclodextrinen kleiner Abmessungen, die in größeren Teilchen eingeschlossen sind, wobei das Verfahren die folgenden Stufen umfaßt:

- a) Zuerst werden Teilchen der vernetzten Cyclodextrine gemäß der vorliegenden Erfindung in einem Emulsionssystem vom Wasser-in-Öl-Typ hergestellt und gewonnen.
- b) Diese Teilchen werden anschließend in eine wäßrige Lösung eines aktiven Wirkstoffs bei einem pH-Wert zwischen etwa 4,5 und etwa 8 während einer ausreichenden Zeidauer gegeben oder darin inkubiert, um den aktiven Wirkstoff in den Teilchen einzuschließen.
- c) Ein Protein oder ein Protein/Polysaccharid-Gemisch wird anschließend in der Suspension der Teilchen gelöst.
- d) Das Gemisch wird durch Rühren in einer hydrophoben Phase unter Bildung einer Emulsion vom Wasser-in-Öl-Typ dispergiert.
- e) Eine Lösung eines polyfunktionellen Acylierungsmittels wird der Emulsion zugegeben wobei das Rühren eine ausreichende Zeidauer beibehalten wird, so daß sich um die Teilchen aus den vernetzten Cyclodextrinen gemäß der vorliegenden Erfindung durch Acylierung der acylierbaren funktionellen Gruppen des Proteins oder Protein/Polysaccharid-Gemisches herum größere Teilchen bilden.
- f) Gegebenenfalls werden die erhaltenen größeren Teilchen, die die intakten Teilchen der vernetzten Cyclodextrine gemäß der vorliegenden Erfindung und den teilweise durch die Cyclodextrine der Teilchen der vernetzten Cyclodextrine komplexierten aktiven Wirkstoff enthalten, abgetrennt.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann diese wäßrige Lösung aus einem Puffer, beispielsweise einem Carbonat- oder Phosphatpuffer, der auf einen pH-Wert größer 10,5, beispielsweise auf einen pH-Wert von 11, eingestellt ist, oder einer Lösung aus einem alkalischen Stoff, beispielsweise Natriumhydroxid, beispielsweise 1 M Natriumhydroxidlösung, bestehen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung beträgt die Konzentration des Monosaccharids oder Oligosaccharids in der wäßrigen Phase 3 bis 80, vorzugsweise 10 bis 30%.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung besteht das oben erwähnte Polyfunktionelle acylierende Vernetzungsmittel vorzugsweise aus mindestens einem Säuredihalogenid, das vorzugsweise aus Phthaloyl-, Terephthaloyl-, Cebacoyl-, Glutaryl-, Adipoyl- und Succinylidihalogeniden oder einem Anhydrid dieser Säuren ausgewählt ist. Vorzugsweise wird ein Dichlorid dieser Säuren verwendet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die oben erwähnten Mikrokapseln durch Grenzflächenvernetzung vorzugsweise bei Raumtemperatur aus einer Emulsion, deren disperse einzukapselnde Phase eine oder mehrere wasserlösliche, lipophile oder unlösliche aktive Substanzen, die in Form einer Lösung, Suspension oder Emulsion eingebaut werden, enthält hergestellt.

Gemäß einem dritten Merkmal umfaßt die vorliegende Erfindung ferner die Verwendung dieser Teilchen.

Die allgemeinen Anwendungen der Teilchen der vernetzten Monosaccharide und Oligosaccharide sind die folgenden: Auf dem Gebiet der Kosmetika, Pharmazetika und Nahrungsmittel erlauben diese biokompatiblen und bioabbaubaren

DE 199 32 216 A 1

Teilchen den Einbau wasserlöslicher oder lipolöslicher Substanzen in Form von Lösungen, Suspensionen oder Emulsionen.

Die erfindungsgemäßen Teilchen besitzen einen speziellen weiteren Wert bei Kosmetika. Dies ist mit der in-situ-Freisetzung nach Hydrolyse des Basisbestandteils, der eine gewünschte spezielle Aktivität auf der Haut, beispielsweise eine feuchthalrende Wirkung von Monosacchariden und Disacchariden (Lactose) oder der daraus herstammenden Polyole (Mannit, Sorbit), eine stimulierende Wirkung auf die Glykosaminoglykansynthese oder eine Antifaltenwirkung (Glucosaminulfat, Galactosaminulfat, beta-Xylosidderivate) aufweisen kann, verbunden.

Es sei ferner auf den Wert der Einkapselung hydrophober Tröpfchen in eine sehr hydrophile Membran aus beispielsweise vernetztem Sorbit oder vernetzter Saccharose hingewiesen.

Die Anwendungen der Teilchen der vernetzten Cyclodextrine sind die folgenden:

*Als solche unbeladen zur Entfernung eines Bestandteils aus einem Medium in Form eines Einschlußkomplexes:

- für technologische Anwendungen, beispielsweise die Trennung von Stereoisomeren, die Katalyse von chemischen Reaktionen und die Extraktion von bitteren Molekülen, Coffein, Cholesterin und Phenylalanin. Die Teilchen können so ein beispielsweise für das Packen von Säulen, durch die eine zu reinigende Flüssigkeit geführt wird, zu verwendendes festes Adsorptionsmittel darstellen.
- für die Entgiftung biologischer oder nicht biologischer flüssiger Medien und Wasser, insbesondere zur Extraktion von aromatischen Aminen, Phenolen, Bilirubin und Toxinen. Die Bioverträglichkeit der Teilchen ist ein wichtiger Vorteil hierbei.
- für die Gewinnung einer Substanz aus einem flüssigen Medium.
- für analytische Anwendungen, wobei die Teilchen eine Verbesserung des Nachweises von Substanzen durch eine Aufkonzentration derselben ermöglichen
- auf dem Gebiet der Kosmetika, wo die Einschlußeigenschaften von Cyclodextrinen zur Absorption von überschüssigen Lipiden auf der Haut (Mattierungswirkung) oder zur Absorption von Abbauverbindungen einer Ausdunstung (Deodorantprodukte) oder der für einen schlechten Atem verantwortlichen Produkte (gegen einen schlechten Atem gerichtete Wirkung in Zahnpasten oder Mundwässern) verwendet werden können. Die Bioverträglichkeit der Teilchen ist abermals ein wichtiger Vorteil hierbei.

*Beladen mit aktiven Substanzen in Form von Einschlußkomplexen und eingebaut in für eine langsame Diffusion sorgenden Systemen, insbesondere in Teilchen und speziell in Teilchen aus vernetzten Proteinen oder covernetzten Proteinen und Polysacchariden:

- auf dem Gebiet der Kosmetik für eine langsamere und langanhaltende Freisetzung der aktiven Substanz unter Gewährleistung einer längeren Wirkung, wobei die Hauttoleranz gegenüber aktiven Wirkstoffen mit einer reizenden Wirkung, beispielsweise Retinsäure, Salicylsäure usw., verbessert wird.
- auf dem Gebiet der Therapeutika zur Herstellung von Arzneimitteln oder pharmazeutischen Zusammensetzungen mit einer langsameren oder länger anhaltenden Freisetzung der aktiven Substanz unter Gewährleistung einer längeren Wirkung auf jedem beliebigen Verabreichungsweg unter Verbesserung der Haut- und Schleimhauttoleranz.

Die Anwendungen der Teilchen aus vernetztem DHA sind mit der Stabilisierung des DHAs verbunden, wobei der Einbau in verschiedene kosmetische Zubereitungen und die Freisetzung des DHAs nach enzymatischem Abbau auf der Oberfläche der Haut gewährleistet ist, wobei das DHA sich mit den Aminosäuren in der Haut unter Bildung einer Pigmentierung vereinigen kann.

Die Teilchen der vernetzten Heteroside besitzen Anwendungen, die insbesondere mit der Tatsache verbunden sind, daß sie neue Vorläufer eines speziellen Typs darstellen:

- die in Kosmetika verwendet werden können, um für eine langsame Freisetzung durch den enzymatischen Abbau des Teilchens, d. h. des Heterosidbestandteils, der anschließend seine spezielle Aktivität (beispielsweise Teilchen aus vernetztem Saponosid) austübt, sorgt und
- die in Therapeutika verwendet werden können, worin die Teilchen einen neuen Typ eines teilchenförmigen Vektors oder einer Prodrug darstellen, der (die) gleichzeitig die folgenden Eigenschaften gewährleistet (gewährleisten):
- Schutz des aktiven Wirkstoffs und eine langsame Freisetzung des Heterosidbestandteils durch enzymatischen Abbau des Teilchens für eine längere Wirkung und/oder eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit und/oder eine Verbesserung der Haut- oder Schleimhauttoleranz und
- eine zielgerichtete Steuerung in Verbindung mit der speziellen Natur der Prodrug.

In Abhängigkeit von der Größe der Teilchen ist es möglich, beispielsweise Teilchen mit einem Durchmesser zwischen etwa 10 und 100 µm, beispielsweise von etwa 15 µm aus einem Antibiotikum, wie Streptomycin, herzustellen. Nach einer intravenösen Injektion ermöglichen diese Teilchen ein zielgerichtetes Ansteuern der Kapillaren der Lunge gemäß dem bekannten Prinzip der Vektorisierung durch Kapillarblockierung (S. S. Davis und L. Illum, Acta Pharm. Technol., 1986, 32, 4-9) und die langsame Freisetzung des Antibiotikums in situ für eine bessere Wirksamkeit. Alternativ können Nanopartikel der aktiven Substanz hergestellt werden, die durch die Zellen insbesondere die Zellen des retikuloendothelialen Systems aufgenommen werden und die die Behandlung von bakteriellen oder parasitären Erkrankungen mit der aktiven Substanz ermöglichen.

Als eine weitere Alternative kann die Herstellung von Teilchen im Nanometergrößenbereich aus Oligonucleotiden oder Oligodesoxynucleotiden direkt eine vektorisierte und stabile Form dieser Oligonucleotide oder Oligodesoxynucleotide liefern, die direkt in die Zellen eindringen kann und das anfängliche Oligonucleotid oder Oligodesoxynucleotid in

der Zelle freizusetzen vermag. Dies ist insbesondere zur Verwendung bei einer antiviralen oder Antikrebstherapie oder im Zusammenhang mit einer Gentherapie oder zur Verwendung bei der Transfektion von Zellen oder dem Transfer von genetischem Material von Bedeutung, weil dadurch die Verwendung von viralen Vektoren oder synthetischen Vektoren vermieden wird. Als eine weitere Alternative kann die Herstellung von Teilchen einer Größe im Nanometerbereich aus antiviralen oder Antikrebsnukleosiden direkt eine vektorisierte und stabile Form dieser Nukleoside liefern, die direkt in die Zellen eindringen kann und die das anfängliche Nukleosid in der Zelle freizusetzen vermag.

Gemäß einem vierten Merkmal umfaßt die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung, die insbesondere aus einer kosmetischen Zusammensetzung, einer pharmazeutischen Zusammensetzung und einer Nahrungsmittelzusammensetzung ausgewählt ist und die als eine ihrer Komponenten oder aktiven Wirkstoffe die oben genannten Teilchen umfaßt, die mindestens auf der Oberfläche eine Wand umfassen, die aus einem oder mehreren Monosacchariden oder Oligosacchariden gebildet ist, die speziell durch eine Grenzflächenvernetzung in Emulsion vorzugsweise bei Raumtemperatur zwischen (einem) Monosaccharid(en) oder Oligosaccharid(en) mit mindestens einer primären Alkoholgruppe und einem polyfunktionellen acylierenden Vernetzungsmittel, vorzugsweise einem Disäurehalogenid und insbesondere einem Disäurechlorid zur Herstellung von Esterbindungen zwischen den acylierbaren Hydroxylgruppen des (der) primären Alkohols (Alkohole) des Monosaccharids oder Oligosaccharids und den Acylgruppen des polyfunktionellen Acylierungsmittels vernetzt sind.

Weitere Eigenschaften dieser Teilchen sind aus der obigen Beschreibung und aus der folgenden Beschreibung in den Beispielen offensichtlich.

Gemäß einem fünften Merkmal umfaßt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur kosmetischen oder therapeutischen Behandlung durch Applikation einer kosmetisch oder therapeutisch wirksamen Menge der oben genannten Teilchen, die mindestens auf der Oberfläche eine Wand umfassen, die aus einem oder mehreren Monosacchariden oder Oligosacchariden gebildet ist, die speziell durch Grenzflächenvernetzung in Emulsion vorzugsweise bei Raumtemperatur zwischen dem (den) Monosaccharid(en) oder Oligosaccharid(en) mit mindestens einer primären Alkoholgruppe und einem polyfunktionellen acylierenden Vernetzungsmittel, vorzugsweise einem Disäurehalogenid und insbesondere einem Disäurechlorid unter Bildung von Esterbindungen zwischen acylierbaren Hydroxylgruppen des (der) primären Alkohols (Alkohol) des Monosaccharids oder Oligosaccharids und den Acylgruppen des polyfunktionellen Acylierungsmittels vernetzt sind, auf eine geeignete Stelle eines Säugetiers, vorzugsweise eines Menschen.

Weitere Eigenschaften dieser Teilchen sind aus der obigen und folgenden Beschreibung, insbesondere unter Bezugnahme auf die Beispiele und in ähnlicher Weise auf die oben genannten kosmetischen und therapeutischen Verwendungen, insbesondere im Zusammenhang mit der Beschreibung des zweiten Merkmals, ohne Schwierigkeiten offensichtlich.

In einer speziellen Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur kosmetischen Behandlung eines Säugetiers, vorzugsweise eines Menschen durch topische Applikation der oben definierten Teilchen und speziell von Teilchen, die ferner mindestens eine kosmetisch aktive Substanz enthalten können, auf einen fraglichen Bereich der Haut, Kopfhaut oder des Haares.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt die vorliegende Erfindung ferner ein Verfahren zur therapeutischen Behandlung durch Applikation einer therapeutisch wirksamen Menge der oben genannten Teilchen, die mindestens auf der Oberfläche eine Wand umfassen, die aus vernetzten Cyclodextrinen, insbesondere β -Cyclodextrinen, gebildet ist, wobei die Teilchen mit einer aktiven Substanz beladen sind und in größeren biokompatiblen und bioabbaubaren Teilchen, beispielsweise Teilchen aus vernetzten Proteinen oder covernetzten Proteinen und Polysacchariden, eingeschlossen sind, wobei diese doppelten Teilchen ein für eine langsame Freisetzung sorgendes System darstellen, das auf einem beliebigen Verabreichungsweg, beispielsweise dem oralen, parenteralen, rektalen, vaginalen, pulmonalen, kutanen, ophthalmischen oder nasalen Weg verabreicht werden kann, auf eine geeignete Stelle eines Säugetiers, vorzugsweise eines Menschen.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt die vorliegende Erfindung ferner ein Verfahren zur therapeutischen Behandlung durch Applikation einer therapeutisch wirksamen Menge der oben genannten Teilchen, die mindestens auf der Oberfläche eine Wand umfassen, die aus einem oder mehreren vernetzten Heterosiden gebildet ist, wobei die Teilchen sich als teilchenförmige Prodrugs oder Vorfäule des (der) aktiven Heterosids (Heteroside) verhalten und den aktiven Wirkstoff in vivo unter Einwirkung von Enzymen, wie Esterasen, freisetzen können, wobei die Teilchen auf einem beliebigen Verabreichungsweg, beispielsweise dem oralen, parenteralen, rektalen, vaginalen, pulmonalen, kutanen, ophthalmischen oder nasalen Weg verabreicht werden können und den Schutz des aktiven Wirkstoffs, eine langsame Freisetzung, eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit, einer Verbesserung der Haut- oder Schleimhauttoleranz, ein zielgerichtetes Ansteuern eines Organs, eines Gewebes oder eines Vaskulärbereichs oder im Fall von Nanoteilchen eine Passage der aktiven Wirkstoffe in die Zielzellen für eine antibiotische, antivirale oder Antikrebstherapie oder für einen Transfer des genetischen Materials in die Zellen gewährleisten, auf eine geeignete Stelle eines Säugetiers, vorzugsweise eines Menschen.

Weitere Aufgaben, Eigenschaften und Vorteile der vorliegenden Erfindung eröffnen sich in eindeutiger Weise aus der folgenden erklärenden Beschreibung anhand von verschiedenen erfindungsgemäßen Beispielen, die lediglich veranschaulichen sollen und den Umfang der vorliegenden Erfindung in keinster Weise einschränken sollen, und durch die Bezugnahme auf die beigefügten Figuren. Es zeigen:

Fig. 1 ein rasterelektronenmikroskopisches Negativ von Teilchen gemäß der vorliegenden Erfindung, die aus β -Cyclodextrinen in einer Konzentration von 10% unter Verwendung einer Rührgeschwindigkeit von 2000/min hergestellt wurden, gemäß Beispiel 7.

Fig. 2 ein aus nicht-vernetzten β -Cyclodextrinen (a) und ein aus Teilchen vernetzter β -Cyclodextrine gemäß der vorliegenden Erfindung, die aus β -Cyclodextrinen in einer Konzentration von 7,5% unter Verwendung einer Rührgeschwindigkeit von 5000/min hergestellt wurden (b) erhaltenes Infrarotspektrum gemäß Beispiel 7.

Fig. 3 die Ergebnisse eines Experiments der Diffusion von Propanol durch eine Dialysemembran beispielsweise gemäß Beschreibung in Beispiel 11. Diese Figur vereinigt drei Kurven, die die zu unterschiedlichen Zeiten freigesetzten Propanolmengen, ausgedrückt als Prozentsatz der anfänglichen Menge, angeben, wobei eine der Kurven einem ohn-

Zugabe von β -Cyclodextrinteilchen durchgeführten Experiment (Vergleichsprobe) und die anderen beiden zwei mit entsprechender Zugabe von 10 mg oder 50 mg der Teilchen aus vernetzten β -Cyclodextrinen gemäß der vorliegenden Erfindung durchgeführten Experimenten entsprechen.

Fig. 4 die Ergebnisse eines Experiments der Freisetzung von Methylenblau aus Mikrokapseln von vernetztem Serumalbumin gemäß Beschreibung in Beispiel 12. Die Figur vereinigt fünf Kurven, die die Mengen von zu unterschiedlichen Zeitpunkten freigesetztem Methylenblau, ausgedrückt als prozentuale Menge der anfänglichen Menge (Mittelwerte \pm Standardabweichung), angeben, wobei eine dieser Kurven einem ohne Zugabe von β -Cyclodextrin durchgeführtem Experiment (Vergleichsprobe), eine einem unter Zugabe von 50 mg aus nicht-vernetzten β -Cyclodextrinen durchgeführtem Experiment und die anderen drei unter entsprechender Zugabe von 20 mg, 50 mg bzw. 100 mg der Teilchen aus vernetzten β -Cyclodextrinen gemäß der vorliegenden Erfindung durchgeführten Experimenten entsprechen.

In den folgenden Beispielen sind alle Prozente, sofern nicht anders angegeben, auf das Gewicht bezogen. Sofern nicht anders angegeben ist die Temperatur Raumtemperatur und der Druck Atmosphärendruck.

Beispiel 1

Standardprotokoll zur Herstellung von Teilchen aus vernetzten Oligosacchariden oder Monosacchariden in einem Emulsionssystem vom "Wasser-in-Öl"-Typ

- a) Es wird eine 10%ige Lösung eines Oligosaccharids oder Monosaccharids in 1 M Natriumhydroxidlösung hergestellt.
- b) 6 ml dieser Lösung werden in 30 ml Cyclohexan, das 5% Span 85 enthält, durch fünfminütiges mechanisches Rühren bei einer Geschwindigkeit von 2000/min emulgiert.
- c) Ohne Unterbrechen des Rührens werden 40 ml einer 5%igen Lösung von Terephthaloylchlorid in einem Chloroform/Cyclohexan-Gemisch (1 : 4 (v/v)) zu der Emulsion zugegeben und das Verrühren 30 min fortgesetzt. Nach Beendigung der Reaktion wird das Reaktionsmedium durch Zugabe von 40 ml Cyclohexan verdünnt und das Rühren 2-3 min fortgesetzt.
- d) Die Mikrokapseln werden anschließend durch natürliches Dekantieren oder durch Zentrifugieren abgetrennt.
- e) Das Sediment wird durch nachfolgendes Resuspendieren in verschiedenen Medien d. h. in Cyclohexan, in 95% Ethanol mit 2% zugesetztem Tween 20, in 95% Ethanol und in destilliertem Wasser gewaschen.

Dieses Protokoll wird für die folgenden Verbindungen (Sigma, sofern nicht anders angegeben) die als Beispiele angegeben sind, erfolgreich verwendet:

- Beispiel 1.1. β -Cyclodextrine
- Beispiel 1.2. Dextrin (Glucidex 40 \circ oder Glucidex 47 \circ , Roquette)
- Beispiel 1.3. Raffinose
- Beispiel 1.4. Cellobiose
- Beispiel 1.5. Saccharose
- Beispiel 1.6. Maltose
- Beispiel 1.7. Lactose
- Beispiel 1.8. Trehalose
- Beispiel 1.9. Dihydroxyaceton (DHA)
- Beispiel 1.10. D-Fructose
- Beispiel 1.11. Sorbose
- Beispiel 1.12. D-Ribose
- Beispiel 1.13. D-Desoxyribose
- Beispiel 1.14. D-Xylose
- Beispiel 1.15. Paranitrophenyl-beta-D-xylosid
- Beispiel 1.16. D-Arabinose
- Beispiel 1.17. D-Glucose
- Beispiel 1.18. D-Mannose
- Beispiel 1.19. D-Galactose
- Beispiel 1.20. Xylit
- Beispiel 1.21. Erythrit
- Beispiel 1.22. Arabit
- Beispiel 1.23. Sorbit
- Beispiel 1.24. Mannit
- Beispiel 1.25. Dulcit (Galactit)
- Beispiel 1.26. Maltit
- Beispiel 1.27 Gluconsäure
- Beispiel 1.28. Gluconolacton
- Beispiel 1.29. D-Glucosamin
- Beispiel 1.30. D-Galactosamin
- Beispiel 1.31. D-Glucosaminsulfat
- Beispiel 1.32. D-Galactosaminsulfat
- Beispiel 1.33. Saponin aus Seifenrinde
- Beispiel 1.34. Guanosin
- Beispiel 1.35. Streptomycinsulfat
- Beispiel 1.36. Riboflavin

DE 199 32 216 A 1

Beispiel 1.37. Desoxyribonucleinsäure (DNA) aus Heringssperma (rohe Oligonucleotide)

Beispiel 1.38. Uridin

Beispiel 1.39. Lactit Es wurden kugelförmige Teilchen einer Größe zwischen einigen μm und einigen $10\text{ }\mu\text{m}$ ($20\text{--}90\text{ }\mu\text{m}$) erhalten.

Beispiel 2

Varianten der Herstellung von Teilchen aus vernetzten Oligosacchariden oder Monosacchariden in einem Emulsionssystem vom "Wasser-in-Öl"-Typ

- 1) Die Konzentration an Oligosaccharid oder Monosaccharid in der wässrigen Phase kann zwischen 2 und 80% schwanken.
- 2) Die 1 M Natriumhydroxidlösung kann durch Natriumhydroxidlösungen oder Lösungen eines anderen alkalischen Mittels, beispielsweise Kaliumhydroxid, die stärker konzentriert (2 M, 5 M usw.) oder verdünnter sind, oder durch Puffer, die auf einen pH-Wert von größer 10 gebracht wurden beispielsweise einen Carbonat- oder Phosphatpuffer eines pH-Werts von 11 ersetzt werden.
- 3) Das verwendete Oligosaccharid oder Monosaccharid wird vorzugsweise aus der in Beispiel angegebenen Verbindungsgruppe ausgewählt und besteht aus β -Cyclodextrin, Dextrinen, Raffinose, Disacchariden, wie insbesondere Celloflose, Saccharose, Maltofose, Lactose und Trehalose, Monosacchariden, die Ketosen umfassen, wie Dihydroxyaceton (DHA), Fructose und Sorbose, oder Monosaccharide, die Aldosen umfassen, wie Ribose, Desoxyribose, Xylose, Arabinose, Glucose, Mannose und Galactose, Oligosaccharid- oder Monosaccharidderivaten, die insbesondere die entsprechende Polyole umfassen, wie Maltit, im Handel erhältliche Polyole enthaltende Zubereitungen, die durch Hydrieren von Produkten der teilweisen Hydrolyse von Stärke erhalten wurden, Xyli, Erythrit, Arabin, Sorbit, Mannit, Dulcit, Lactit oder Galactit, Aminozuckern, wie Glucosamin, davon abgeleiteten Säuren oder Lactonen wie Gluconsäure und Gluconolacton, Ileterosiden, wie Saponin, Antibiotika, wie Streptomycin, Riboflavin, Guanosin oder Adenosin oder Oligonucleotiden oder Oligodesoxynucleotiden.

Die folgenden Stoffe können auch verwendet werden:

- weitere Cyclodextrine, wie alpha-Cyclodextrin und gamma-Cyclodextrin, Cyclodextrinderivate, wie Hydroxyethyl- β -cyclodextrin und Hydroxypropyl- β -cyclodextrine (2-HP- β -CD, 3-HP- β -CD, 2,3-HP- β -CD) und verzweigte Cyclodextrine, wie Glucosyl- β -CD, Diglucosyl- β -CD, Maltosyl- β -CD und Dimaltosyl- β -CD,
- Gemische aus Oligosacchariden, beispielsweise die von Roquette unter der Bezeichnung Glucidex® vertriebenen Produkte, die verschiedene Anteile an Glucose, Maltose und Maltodextrinen enthalten
- Im Handel erhältliche Zubereitungen, die Polyole enthalten, beispielsweise Néosorb 70® (70% Sorbit, Roquette),
- Desoxyribonucleoside, wie Desoxyguanosin und Desoxycytidin, synthetische antivirale oder Antitumor-Nucleoside, Strukturanaloge natürlicher Nucleoside, wie Adenosin- und Desoxyadenosinanaloge und Cytidin- und Desoxycytidinanaloge, Mononucleotide und Oligonucleotide, sowie Monodesoxynucleotide und Oligodesoxynucleotide.
- 4) Die hydrophobe Phase kann aus einem weiteren organischen Lösungsmittel oder Gemisch von Lösungsmitteln, festen Ölen, wie 2-Ethylhexylcocoat, oder anderen Gemischen, die dem Fachmann auf dem einschlägigen Fachgebiet wohlbekannt sind, bestehen. Die Art und der prozentuale Anteil an zugesetztem grenzflächenaktivem Mittel kann auch schwanken.
- 5) Die Teilchengröße wird durch Verändern der Art und des prozentualen Anteils des grenzflächenaktiven Mittels und/oder der Rührgeschwindigkeit eingestellt. Sie kann $1\text{ }\mu\text{m}$ oder weniger bei Rotationsgeschwindigkeiten von 15.000 bis 20.000/min betragen.

Beispiel 3

Stabilitätsexperimente mit Teilchen aus vernetzten Oligosacchariden oder Monosacchariden in einem Emulsionssystem vom "Wasser-in-Öl"-Typ

Experimentelles Vorgehen

Proben der in destilliertem Wasser suspendierten Teilchen werden in einen Ofen bei 45°C gestellt. Die Proben werden in regelmäßigen Abständen beobachtet, um jede Änderung der Farbe und des Aussehenis nachzuweisen und um die Klarheit des Überstands zu untersuchen. Die Unversehrtheit der Teilchen wird durch mikroskopische Untersuchung überwacht.

Ergebnisse

Die folgenden Teilchen wurden untersucht:

*Teilchen aus
vernetzten β -Cyclodextrinen gemäß Beispiel 1.1.;
vernetzter Saccharose gemäß Beispiel 1.5.;
vernetztem DHA gemäß Beispiel 1.9.;
vernetzter Fructose gemäß Beispiel 1.10.;

vernetztem Mannit gemäß Beispiel 1.24;
vernetztem Glucosamin gemäß Beispiel 1.29 und
vernetztem Saponin gemäß Beispiel 1.33.

Bei der Mehrzahl der Teilchen wurde eine Stabilität von mehr als drei Monaten beobachtet: Die Farbe des Teilchen-sediments blieb unverändert (weiß oder cremeifarben), der Überstand ist klar und farblos und eine mikroskopische Untersuchung zeigt intakte Teilchen.

Bei DHA-Teilchen beträgt die Stabilität mehr als vier Monate und bei Teilchen aus vernetztem Mannit beträgt die Stabilität mehr als sechs Wochen.

*Teilchen aus vernetzten β -Cyclodextrinen gemäß Beispiel 1.1. mit der Ausnahme, daß die Cyclodextrinkonzentrationen 7,5 bzw. 5% betragen: Es wird eine Stabilität von mehr als drei Monaten beobachtet.

*Weitere Teilchen wurden gemäß Beispiel 1 hergestellt mit der Ausnahme, daß die 1-M-Natriumhydroxidlösung durch einen Carbonatpuffer eines pH-Werts von 11 ersetzt wurde. Beispiele für solche Teilchen sind: Teilchen aus ver-netzten β -Cyclodextrinen, die mit 10% bzw. 5% Cyclodextrinen hergestellt wurden: Stabilität mehr als 10 Wochen.

Teilchen aus vernetzter Saccharose: Stabilität von mehr als einem Monat.

Teilchen aus vernetztem DHA: Stabilität mehr als 3 Monate.

Beispiel 4

Experimente bezüglich der biologischen Abbaubarkeit bei Teilchen aus vernetzten Oligosacchariden oder Monosaccha-
20 ridein einem Emulsionssystem vom "Wasser-in-Öl"-Typ

Die Teilchen werden gemäß Beschreibung in Beispiel 1 hergestellt mit der Ausnahme, daß die Rührgeschwindigkeit auf 5000/min erhöht wird.

25 a) Abbau der Teilchen in Blutplasma

Experimentelles Protokoll

30 Gefrorenes Humanplasma (Centre de Transfusion Sanguine de Reims) wird verwendet, das zum Zeitpunkt der Ver-wendung aufgetaut wird. 50 mg filtrierte frische Teilchen werden in ein Teströhrchen eingefüllt und in 5 ml Blutplasma dis-pergiert. Das Röhrchen wird in ein 37°C warmes Wasserbad gegeben. Ein Magnetrührer wird durchgeführt. Der Abbau wird unter einem Lichtmikroskop durch Vergleichen mit einem Vergleichsröhrchen, das durch Dispergieren von 50 mg Teilchen in Phosphatpuffer eines pH-Werts von 7,4 hergestellt wurde, verfolgt.

35 Ergebnisse

*Teilchen aus vernetzten β -Cyclodextrinen: Der Abbau beginnt nach 5 h. Sehr reichlich Bruchstücke und offene Teilchen nach 24 h. Zum Vergleich wird in dem Vergleichsröhrchen, das den Puffer eines pH-Werts von 7,4 enthält, kein Ab-bau festgestellt.

40 *Teilchen aus vernetzter Saccharose: Abbau beginnt nach 3 h. Sehr reichliche Bruchstücke der Teilchen nach 24 h: Abbau sehr ausgeprägt, verglichen mit dem Vergleichsröhrchen, in dem die Teilchen intakt sind.

*Teilchen aus vernetztem DHA: Langsamer Abbau, der das Auftreten einer braunen Färbung bedingt. Die Verfärbung ist nach 48 h sehr ausgeprägt. Dies deutet darauf hin, daß das freigesetzte DHA mit den Plasmaproteinen reagiert hat.

45 *Teilchen aus vernetzter Glucose: Nach 1 h verlieren die Teilchen ihre kugelförmige Form und werden ellipsoid. Ein langsafter Abbau wird beobachtet. Nach 24 h sind kleine Fragmente sowie offene Mikrokapseln sichtbar.

*Teilchen aus vernetztem Mannit: Der Abbau beginnt nach 3 h. Sehr reichlich Bruchstücke und offene Teilchen nach 24 h. Kein Abbau im Vergleichsröhrchen.

*Teilchen aus vernetztem Glucosamin: Langsamer Abbau und das Vorhandensein von Bruchstücken nach 24 h.

50 *Teilchen aus vernetztem Saponin: Abbau beginnt nach 2 h: Vorhandensein von Bruchstücken. Nach 24 h haben sich alle Teilchen zu kleinen Fragmenten abgebaut.

Diese Experimente zeigen, daß die den Gegenstand der vorliegenden Erfindung bildenden Teilchen biologisch abbau-bar sind. Während sie nach einer längeren Inkubation in einem Puffer eines pH-Werts von 7,4 intakt bleiben, werden sie im allgemeinen in Blutplasma abgebaut. Dies zeigt eine Sensibilität gegenüber der Einwirkung von Plasmaesterasen, die Esterbindungen aufbrechen, die durch das Vernetzungsmittel mit den Hydroxylgruppen der Monosaccharide oder Oligosaccharide oder den Derivaten hiervon gebildet wurden.

55 b) Abbau der Teilchen aus vernetzter Saccharose durch Invertase

Reagenzien

60 Invertase (Handelsklasse V, Bäckerhefe, SIGMA), die in Form einer 1%igen Dispersion in Acetatpuffer eines pH-Werts von 4,9 verwendet wird.

Experimentelles Protokoll

65 50 mg filtrierte frische Teilchen werden in ein Teströhrchen eingebracht und 5 ml einer 1%igen Dispersion von Inver-tase in Acetatpuffer zugegeben. Das Röhrchen wird in ein 37°C warmes Wasserbad gegeben. Ein Magnetrührer wird in-stalliert. Der Abbau wird unter einem Lichtmikroskop durch Vergleichen mit einem Vergleichsröhrchen, das durch Di-

DE 199 32 216 A 1

spergieren von 50 mg Teilchen in Acetapuffer eines pH-Werts von 4,9 hergestellt wurde, verfolgt.

Darüber hinaus wird das Auftreten von Glucose im Medium mit Hilfe des Clinistix®-Tests (BAYER) sichtbar gemacht: Eine Rosafärbung eines Glucoseoxidaseteststreifens färbt sich in Gegenwart von Glucose violett.

Ergebnis

Nach 6 h: Beginn eines Teilchenabbaus im Lichtmikroskop sichtbar. Der Clinistix-Test ist positiv: Violette Färbung, Ergebnis: +.

Nach 24 h verbleiben lediglich einige isolierte Teilchen intakt. Der Clinistix-Test liefert ein positiveres Ergebnis: Die Verfärbung ist rein violett, Ergebnis: ++. Die Teilchen aus vernetzter Saccharose, die nach Inkubation in Puffer alleine intakt bleiben werden durch die Invertase, ein Enzym mit der Fähigkeit zum Abbau von Saccharose zu Glucose und Fructose, angegriffen.

Beispiel 5

Standardprotokoll zur Herstellung von Teilchen aus vernetzten Oligosacchariden oder Monosacchariden in einem Emulsionssystem vom "Öl-in-Wasser"-Typ

a) Herstellung der einzukapselnden Ölphase:

0,6 ml Sebacoylchlorid werden zu 5,4 ml Olivenöl zugegeben, worauf die Bestandteile gemischt werden. b) Herstellung der wässrigen Phase:

30 ml einer 20%igen Lösung von Saccharose in 1 M Natriumhydroxidlösung werden hergestellt. c) Emulgieren/ Vernetzen:

Die 6 ml öliges Gemisch werden in 30 ml der wässrigen Phase durch Rühren bei 2000/min emulgiert, wobei das Rühren 1 h durchgeführt wird.

d) Die Teilchen werden aus dem Reaktionsmedium beispielsweise durch Zentrifugation abgetrennt.

e) Waschen:

Die Teilchen werden mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen.

Beispiel 6

Charakteristische Eigenschaften der Teilchen aus vernetzten Oligosacchariden oder Monosacchariden in einem Emulsionssystem vom "Öl-in-Wasser"-Typ

Herstellung der Teilchen:

Die folgenden Chargen von Teilchen wurden hergestellt:

*Charge 1: Teilchen aus vernetzter Saccharose gemäß Beispiel 5.

*Charge 2: Teilchen aus vernetzter Saccharose gemäß Beispiel 5, mit der Ausnahme, daß die Saccharosekonzentration in der wässrigen Phase auf 30% erhöht wurde und die Geschwindigkeit auf 5000/min erhöht wurde.

*Charge 3: Hergestellt entsprechend Charge 1, mit der Ausnahme, daß die Saccharose durch Mannit (20%) ersetzt und die Rührgeschwindigkeit auf 5000/min erhöht wurde.

*Charge 4: Hergestellt entsprechend Charge 2, mit der Ausnahme, daß die Saccharose durch Sorbit ersetzt wurde, die Konzentration auf 30% erhöht wurde und die Rührgeschwindigkeit auf 5000/min erhöht wurde.

Charakteristische Eigenschaften der Teilchen

In allen Fällen wird ein cremefarbiger Überstand erhalten, der aus Mikrokapseln besteht, die jeweils ein Öltröpfchen enthalten. Eine mikroskopische Untersuchung zeigt, daß alles Öl eingekapselt wurde. Die Mikrokapseln erscheinen als Kugelchen mit Durchmessern von 20–150 µm mit einer ausgeprägten grauflorigen Membran. Ein auf den Mikroskopbeobachtungsobjektträger ausgeübter hoher Druck führt zu einem Zerbrechen der Mikrokapseln unter Freisetzen des eingekapselten Öls und einer Beobachtung der Membran; die dann wie ein gerissener durchsichtiger Beutel aussieht.

Stabilitätstest bei 45°C

Der Test wird mit den Chargen 2 und 4 in der im Beispiel 3 beschriebenen Weise durchgeführt.

Ergebnisse: Die Mikrokapseln der Charge 2 sind mindestens 5 Wochen bei 45°C und die Mikrokapseln der Charge 4 mindestens 3 Wochen stabil.

Beispiel 7

Charakteristische Eigenschaften der Mikroteilchen aus vernetzten β-Cyclodextrinen (β-CD) als Funktion der Herstellungsparameter

1) Morphologie

Diese wird mit Hilfe eines Lichtmikroskops und eines Rasterelektronenmikroskops untersucht.

– Lichtmikroskop:

DE 199 32 216 A 1

Die gemäß Beispiel 1 hergestellten Teilchen (10% β -CD, 2000/min) nehmen die Form eines weißen Sediments an. Dies wird aus kugelförmigen Teilchen mit fleckigem Inhalt und einer ausgeprägten Membran gebildet. Bei 7,5% β -CD (NP 143) besitzen die Teilchen ein vergleichbares Aussehen. Bei 5% β -CD (NP 50 bis) werden Vesikel mit klarem Inhalt erhalten.

Das Ersetzen der 1 M Natriumhydroxidlösung durch einen Puffer eines pH-Werts von 11 liefert abermals kugelförmige Teilchen mit körnigem Inhalt.

- Rasterelektronenmikroskop:

Die Untersuchung erfolgt mit lyophilisierten Teilchen. Unter all den obigen Bedingungen zeigt die Untersuchung Teilchen mit einer kontinuierlichen Membran, die aufgrund der Lyophilisierung kollabiert. Beispielsweise zeigt Fig. 1 unter den Bedingungen von Beispiel 1 hergestellte Mikroteilchen. Es sei darauf hingewiesen, daß bei Resuspendieren dieser lyophilisierten Teilchen in Wasser diese rasch ihre kugelförmige Form durch Quellen mit Wasser wiedergewinnen.

2) Größe

Diese wird durch eine Laserdiffractionstechnik (Coulter LS 200 Granulometer, Coultronics) bestimmt. Die Ergebnisse werden als Volumen/Durchmesser der Teilchen (Standardabweichung) angegeben.

Ergebnisse

% β -CD	Wässrige Phase	Rührgeschwindigkeit	Mittlere Größe in μm (SD)
10%	1 M Natriumhydroxidlösung	2000/min	34,26 (22,9)
10%	1 M Natriumhydroxidlösung	5000/min	11,28 (5,98)
7,5%	1 M Natriumhydroxidlösung	2000/min	21,65 (10,6)
7,5%	1 M Natriumhydroxidlösung	5000/min	8,40 (4,25)
5%	1 M Natriumhydroxidlösung	2000/min	20,69 (12)

Wie erwartet nimmt die Teilchengröße mit Erhöhung der Rührgeschwindigkeit ab. Ferner nimmt die Teilchengröße ab, wenn die Konzentration der β -Cyclodextrine abnimmt.

3) Infrarotspektrum

Verfahren: Die Infrarotspektren wurden nach der KBr-Scheibentechnik unter Verwendung eines FTIR-Spektrometers (BOMEM, MB-Serie) bestimmt.

Ergebnisse: Beispielsweise vergleicht Fig. 2 das mit nicht-vernetztem β -CD erhaltene IR-Spektrum (Spektrum a) mit dem IR-Spektrum von Teilchen, die gemäß Beispiel 1, mit der Ausnahme, daß die β -CD-Konzentration 7,5% beträgt und die Rührgeschwindigkeit 5000/min beträgt, hergestellt wurden (Spektrum b).

Die Hauptunterschiede zwischen den beiden Spektren sind das Auftreten von Banden bei 1724 cm^{-1} , 1280 cm^{-1} und 731 cm^{-1} im Spektrum der Teilchen (b). Dies deutet auf die Bildung von Esterbindungen der Hydroxylgruppen des β -CD.

4) β -CD-Gehalt der Teilchen: Bestimmung durch Polarimetrie

Verfahren

Die in den Teilchen enthaltene β -CD-Menge wurde durch optische Rotation des β -CD gemäß Beschreibung beispielsweise von N. Behar et al. (S.T.P. Pharma, 1987, 3, 237-247) in einer an Polymere gebundenes β -CD betreffenden Untersuchung gemessen. Die erste Stufe ist eine vollständige Hydrolyse der lyophilisierten Teilchen (60 mg) in 0,5 M Natriumhydroxidlösung (3 ml) nach 45-minütigem Rühren bei 20°C. Das Gemisch wird durch Zugabe von 0,25 M HCl neutralisiert und mit destilliertem Wasser auf 12 ml aufgefüllt. Die Lösung (entspricht 0,5% Teilchen) wird anschließend über eine 0,22- μm -Membran filtriert.

Die Lösung wurde durch Polarimetrie untersucht und mit nicht-vernetztem β -CD verglichen. Es wurde mit nicht-vernetztem β -CD verifiziert, daß die Behandlung mit 0,5 M Natriumhydroxidlösung die Ergebnisse der polarimetrischen Messungen nicht modifizierte.

Das Experiment erfolgte mit zwei Chargen von Teilchen, die gemäß Beispiel 1, mit der Ausnahme, daß die β -CD-Lösung 7,5% betrug und die Rührgeschwindigkeit 5000/min betrug, hergestellt wurden, durchgeführt.

Der restliche Feuchtigkeitsgehalt dieser beiden Chargen wurde mittels eines Feuchtigkeitsanalysators (Typ HR 73, Halogen Moisture Analyzer, Mettler Toledo) bestimmt, um die Ergebnisse mit dem Gewicht der trockenen Teilchen in Verbindung zu setzen.

Ergebnisse

β -CD-Gehalt der Teilchen (in % des Trockengewichts)

Charge 1	68,7%
Charge 2	67,4%
Mittelwert	68%

Die Teilchen enthalten somit 68% Gew.-% β -CD und 32 Gew.-% Terephthalat. Dies entspricht, bezogen auf die Molekulargewichte, einem Mittel von 3,2 mol Terephthalat pro mol β -CD.

5

10

Beispiel 8

Bewertung der Komplexierungseigenschaften der Teilchen aus vernetzten β -Cyclodextrinen gegenüber Paranitrophenol und Bestimmung des Einflusses der Herstellungsparameter

15

1) Komplexierungseigenschaften einer Referenzcharge: Schwankungen hinsichtlich der Probe und der Komplexierungszeit

20

*Die ausgewählte Referenzcharge wird gemäß Beispiel 1, jedoch mit 7,5% β -Cyclodextrinen (7,5% β -CD in 1 M Natriumhydroxidlösung; Rührgeschwindigkeit 2000/min) hergestellt.

*Verschiedene Proben der Mikroteilchen werden bei 20°C in 1 mmol einer auf einen pH-Wert von 4 gepufferten Paranitrophenol (pNP)-Lösung unter Rühren inkubiert. Anschließend wird zu bestimmten Zeitintervallen die Rest-pNP-Konzentration im Überstand durch Spektrophotometrie untersucht, bis ein Gleichgewicht erreicht ist. Die Messungen der optischen Dichte werden verwendet, um die Rest-pNP-Konzentration herzuleiten, aus der die durch die Mikrokapseln gebundene pNP-Menge berechnet wird. Dies wird erstens durch den Prozentsatz der anfänglichen pNP-Menge und zweitens in pro g Mikrokapseln gebundener Menge in μ mol ausgedrückt.

25

Protokoll

30

Steigende Mengen an Mikroteilchen (10, 20, 50 und 100 mg) werden unter Rühren mit einem Magnetrührer in Abwesenheit von Licht über eine zunehmende Zeit hinweg bei Raumtemperatur in 10 ml einer 1 mmolaren Lösung von pNP in Acetatpuffer eines pH-Werts von 4 inkubiert. Eine Inkubation erfolgt pro Gewichtsmenge und pro Kontaktzeit, wobei jedes Experiment wiederholt wird. Nach dem Inkubieren wird die Suspension zentrifugiert. 300 μ l des Überstands werden mit 2,7 ml Acetatpuffer eines pH-Werts von 4 und anschließend 3 ml 0,25 M Natriumhydroxidlösung versetzt. Das Gemisch wird durch eine Membran einer Porosität von 0,22 μ m filtriert. Die optische Dichte wird bei 405 nm gegen eine ohne pNP hergestellte Blindprobe gemessen. Das ganze Experiment wird mit einer neuen Charge von Mikroteilchen wiederholt.

35

Ergebnisse

40

Bindung von Paranitrophenol durch Mikroteilchen aus vernetztem β -CD: Einfluß der Probe und der Inkubationszeit

Probe	10 mg	Gebundene Menge pNP in %/ μ mol pro g Teilchen*				
		5 min	10 min	30 min	1 h	24 h
	10 mg	13/128	12/119	13/134	14/145	11/111
	20 mg	19/96	20/98	21/106	24/121	21/103
	50 mg	36/72	38/76	35/69	42/83	42/83
	100 mg	55/55	53/53	54/54	57/57	61/61

55

* Mittelwert aus vier Bestimmungen

Wie erwartet steigt bei Erhöhung der verwendeten Mikrokapselmenge auch die Menge gebundener pNP, ausgedrückt in % der ursprünglich vorhandenen Menge. Es ist ferner darauf hinzuweisen, daß wenn die Mengen an gebundener pNP in μ mol pro g Mikrokapseln ausgedrückt werden, diese Mengen mit Erhöhung der verwendeten Mikrokapselgewichtsmenge abnehmen. Das pNP breite sich zwischen den Teilchen mehr aus, wenn ihre Zahl zunimmt. Schließlich wird beobachtet, daß rasch ein Gleichgewicht erreicht wird: Die Werte schwanken nicht stark nach einer Kontaktzeit von 5 min, das Plateau wird nach 1 h erreicht.

60

65

2) Einfluß der Herstellungsparameter der Mikroteilchen auf die Komplexierungseigenschaften (bei einer einstündigen Inkubation)

Protokoll

5 Die folgenden Bedingungen wurden für diese Untersuchung eingestellt: Probe: 50 mg, Inkubationszeit bei 20°C: 1 h. Für jeden untersuchten Parameter wurden die Komplexierungseigenschaften der Mikrokapseln bei zwei unterschiedlichen Chargen bewertet, wobei zwei unterschiedliche Inkubationen für jede Charge durchgeführt wurden. Dies ermöglicht ein Verifizieren der Reproduzierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse.

10 10. Die folgenden Schwankungen wurden mit der Referenzcharge (7,5% β -CD, 2000/min) bei zweimaliger Reproduktion (Chargen 1 und 2) untersucht:

15 – Schwankungen der Konzentration von β -CD in der wäßrigen Phase: Erhöhung auf 10% (Chargen 3 und 4) und Abnahme auf 5% (Chargen 5 und 6).
 – Erhöhung der Rührgeschwindigkeit auf 5000/min (Chargen 7 und 8)
 – Verringerung der Konzentration an Terephthaloylchlorid auf 2,5% (Chargen 9 und 10).

20 Der mittlere Durchmesser aller dieser Teilchen dieser Chargen wurde mittels eines Coulter-LS 200-Granulometers bestimmt.

Ergebnisse

25 a) Bindung von pNP während 1 h durch die Referenzchargen: Chargen 1 und 2 (7,5% β -CD; TC: 5%; Rührgeschwindigkeit: 2000/min)

Charge	Charge 1		Charge 2	
Mittlere Teilchengröße (Standardabweichung)	28,02 (17,1)		24,8 (13,7)	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
Gebundenes pNP in μ mol/g	83,6	83,6	82,6	84,5
Mittelwert der Chargen 1 und 2	83			

40 b) Bindung von pNP während 1 h durch die Chargen 3 und 4: Erhöhung der Konzentration von β -CD (10% β -CD; TC: 5%; Rührgeschwindigkeit: 2000/min)

Charge	Charge 3		Charge 4	
Mittlere Teilchengröße (Standardabweichung)	34,26 (22,9)		35,3 (20,4)	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
Gebundenes pNP in μ mol/g	79,8	72,2	79,4	75,4
Mittelwert der Chargen 3 und 4	77			

55 c) Bindung von pNP während 1 h durch die Chargen 5 und 6: Verringerung der Konzentration an β -CD (5% β -CD; TC: 5%; Rührgeschwindigkeit: 2000/min)

Charge	Charge 5		Charge 6	
Mittlere Teilchengröße (Standardabweichung)	20,69 (12)		22,4 (10)	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
Gebundenes pNP in μ mol/g	93,4	91,6	93,4	89,8
Mittelwert der Chargen 5 und 6	92			

DE 199 32 216 A 1

d) Bindung von pNP während 1 h durch die Chargen 7 und 8: Erhöhung der Rührgeschwindigkeit (7,5% β -CD; TC: 5%; Rührgeschwindigkeit: 5000/min)

Charge	Charge 7		Charge 8	
Mittlere Teilchengröße (Standardabweichung)	11,36 (10)		10,43 (7,37)	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
Gebundenes pNP in $\mu\text{mol/g}$	99,0	97,0	97,4	97,6
Mittelwert der Chargen 7 und 8	98			

e) Bindung von pNP während 1 h durch die Chargen 9 und 10: Verringerung der Konzentration an Terephthaloylchlorid auf 2,5% (7,5% β -CD; Rührgeschwindigkeit: 2000/min)

Charge	Charge 9		Charge 10	
Mittlere Teilchengröße (Standardabweichung)	29,53 (14,7)		30,4 (16,2)	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
Gebundenes pNP in $\mu\text{mol/g}$	87,6	85,8	82,2	84,8
Mittelwert der Chargen 9 und 10	85			

Verglichen mit der Referenzcharge, die 83 μmol pro g bindet, ist so darauf hinzuweisen, daß die Komplexierungseigenschaften mit der Konzentration von β -CD in der wäßrigen Phase schwanken: Sie werden bei 10% verringert (77 $\mu\text{mol/g}$) und bei 5% erhöht (92 $\mu\text{mol/g}$).

Des weiteren stellt die Erhöhung der Rührgeschwindigkeit, die Mikrokapseln kleinerer Größe und somit größerer Oberfläche liefert, einen günstigen Faktor dar (98 $\mu\text{mol/g}$). Andererseits führt eine Verringerung der Konzentration des Vernetzungsmittels auf 2,5% zu keiner Modifikation der Komplexierungseigenschaften.

Beispiel 9

Bewertung der Komplexierungseigenschaften von Teilchen aus vernetzten β -Cyclodextrinen gegenüber Propanolol

Propanolol ist ein Arzneimittel, das das adrenerge System blockiert. Es wurde aufgrund seiner hohen Löslichkeit in Wasser und seiner hohen Affinität für β -CD aufgrund der Tatsache, daß die Naphthalingruppe des Moleküls in den hydrophoben Hohlraum von β -CD paßt (Behar et al., S.T.P. Pharma, 1987, 3, 237-247) für diese Untersuchung ausgewählt.

Protokoll

β -CD-Teilchen wurden aus einer 7,5%igen Lösung in 1 M Natriumhydroxidlösung bei einer Rührgeschwindigkeit von 5000/min hergestellt. Die Komplexierungseigenschaften wurden nach Rühren einer 10-mg-Probe aus lyophilisierten Teilchen in 10 ml einer 1 mmolaren oder 2 mmolaren Lösung von Propanolol in Phosphatpuffer eines pH-Werts von 7,4 in Abwesenheit von Licht bewertet. Nach diesem Kontakt wurde die Suspension zentrifugiert, der Überstand gewonnen und das nicht gebundene Propanolol durch UV-Spektrophotometrie bei 290 nm gemessen. Bei jeder der beiden Propanololkonzentrationen wurden zwei Chargen untersucht und zwei Tests pro Charge durchgeführt. Die Ergebnisse sind in μmol gebundenes Propanolol pro g trockene Mikrokapseln ausgedrückt.

Ergebnisse

Durch β -CD-Mikrokapseln nach einstündiger Inkubation in 10 ml einer 1 mmol oder 2 mmol Propanolol-Lösung gebundenes Propanolol (in $\mu\text{mol/g}$)

Titer der Propanolol-Lösung	1 mmol		2 mmol	
	1	2	3	4
Chargen-Nr.				
Gebundenes Propanolol ($\mu\text{mol/g}$)				
Test 1	509	492	835	794
Test 2	495	485	805	811
Mittelwert	495		811	

Diese Ergebnisse bleiben unverändert, wenn die Inkubation auf 2 oder 3 h verlängert wird.

Beispiel 10

Reversibilität der Komplexierung von Propanolol durch Teilchen aus vernetzten β -Cyclodextrinen und Wiederverwendung

Die β -CD-Teilchen wurden gemäß Beschreibung in Beispiel 9 hergestellt und lyophilisiert.

Untersuchungsprotokoll

1) Komplexierungsstufe

Eine 10-mg-Probe aus Mikrokapseln wurde in 10 ml einer 1 mmolaren Lösung von Propanolol in Phosphatpuffer eines pH-Werts von 7,4 inkubiert. Nach einstündigem Rühren wurde die Suspension zentrifugiert und das Propanolol im Überstand gemessen.

2) Dekomplexierungsstufe

Die abzentrifugierten Mikroteilchen wurden in 50 ml Phosphatpuffer eines pH-Werts von 7,4 dispersiert und 15 min mit Hilfe eines Magnetrührers verrührt. Sie wurden anschließend aus dem Medium abgetrennt. Das in den Überstand freigesetzte Propanolol wurde gemessen.

Die Teilchen wurden anschließend in 50 ml frischem Puffer redispergiert. Nach einem 15-minütigen Rühren mit einem Magnetrührer wurden sie aus dem Medium abgetrennt und abermals in 50 ml frischem Puffer inkubiert. Nach dieser Behandlung zeigt eine spektrophotometrische Bestimmung des in den Puffer freigesetzten Propanolols, daß alles Propanolol aus dem Komplex mit den vernetzten β -CD freigesetzt wurde.

3) Wiederverwendung der Mikroteilchen für eine weitere Komplexierung

Die obigen Mikroteilchen, aus denen das Propanolol entfernt worden war, wurden abermals in 10 ml einer 1-mmol-Lösung von Propanolol in einem Phosphatpuffer eines pH-Werts von 7,4 inkubiert. Nach einstündigem Rühren wurde die Suspension zentrifugiert und das Propanolol im Überstand gemessen. Das Experiment wurde wiederholt.

Ergebnisse

*Test Nr. 1:

- Durch 10 mg der Teilchen während der Komplexierungsstufe 1 gebundene Propanololmenge: 514 $\mu\text{mol/g}$ trockene Teilchen.
- Durch 10 mg der Teilchen in der Wiederverwendungsstufe 3 nach dreimaligem Waschen in der Dekomplexierungsstufe gebundene Propanololmenge: 517 $\mu\text{mol/g}$.

*Test Nr. 2:

- Durch 10 mg der Teilchen während der Komplexierungsstufe 1 gebundene Propanololmenge: 512 $\mu\text{mol/g}$ trockene Teilchen.
- Durch 10 mg der Teilchen in der Wiederverwendungsstufe 3 nach dreimaligem Waschen in der Dekomplexierungsstufe gebundene Propanololmenge: 523 $\mu\text{mol/g}$.

Dieses Experiment zeigt, daß die β -CD-Teilchen mit einer Substanz beladen und anschließend entladen und mit der

selben Einschlußkapazität wiederverwendet werden können.

Beispiel 11

Dialysetest mit einer Propanolol-Lösung, die steigende Gewichtsmengen von Teilchen aus vernetzten β -Cyclodextrinen enthält: Nachweis einer langsameren Freisetzung des aktiven Wirkstoffs Behar et al. (S.T.P. Pharma, 1987, 3, 237-247) zeigten unter Verwendung von Propanolol, daß an lösliche oder unlösliche Polymere gebundenes β -CD eine Verlangsamung der Diffusion dieses aktiven Wirkstoffs durch eine Dialysemembran ermöglicht, wobei das Polymer (und der Komplex aus dem aktiven Wirkstoff und dem an das Polymer gebundenen β -CD) nicht in der Lage ist, durch die Membran hindurchzutreten.

Ein vergleichbares Experiment wurde mit den Mikroteilchen aus vernetztem β -CD (hergestellt gemäß Beispiel 9) durchgeführt.

Protokoll

1) Stufe, die eine Komplexierung des Propanolols durch die Teilchen umfaßt

Eine Probe aus 10 mg bzw. 50 mg lyophilisierten Mikroteilchen wurde in 10 ml einer 2 millimolaren Lösung von Propanolol in einem Phosphatpuffer eines pH-Werts von 7,4 inkubiert. Anschließend wurde 1 h bei Raumtemperatur in Abwesenheit von Licht gerührt.

2) Untersuchung der Diffusion des Propanolols durch die Dialysemembran

Die 10 ml der Suspension der β -CD-Mikroteilchen in der Propanolol-Lösung werden in ein Dialyserohr (SPECTRA POR: Celluloseestermembran, Molekül-cut-off: 5000, Durchmesser: 15 mm), das zuvor mit einem Phosphatpuffer eines pH-Werts von 7,4 gespült worden war, eingebracht. Das Rohr wird mit zwei Clips verschlossen, wobei der untere magnetisch ist und ein Rühren des Systems erlaubt. Dieses Rohr wird anschließend in ein Becherglas eingebracht, das 140 ml Phosphatpuffer eines pH-Werts von 7,4 enthält. Das Ganze wird in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt und ein Rühren mit dem Magnetrührer gestartet.

Proben des Freisetzungsmediums werden in regelmäßigen Zeitabständen entnommen, so daß das Propanolol, das hindurchdiffundiert ist, durch UV-Spektrophotometrie bei 290 nm bestimmt werden kann. Nach der Messung wird die Probe zurück in das Medium gegeben, um das Volumen bei konstant 140 ml zu halten.

Drei Bestimmungen wurden für jede der beiden Proben der Teilchen (10 mg und 50 mg) durchgeführt. Die Ergebnisse sind als durchschnittliche Prozentwerte (mit Standardabweichung) des freigesetzten Propanolols, bezogen auf die in das Dialyseröhrchen eingebrachte Menge, ausgedrückt. Eine Reihe von drei Tests wird ferner mit Propanolol ohne Zugabe von Mikroteilchen (Vergleichstest) durchgeführt.

Ergebnisse

Diffusion von Propanolol durch die Dialysemembran und Wirkung der Zugabe von β -CD-Teilchen

% freigesetztes Propanolol: Mittelwert (Standardabweichung) nach										
	30	1 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h
	min	30 min								
Vergleichsprobe ohne Teilchen	21,1	37,8	50,1	60,2	74,7	82,2	87,1	90	91,7	93,3
(2)	(1,5)	(1,6)	(0,7)	(0,5)	(0,6)	(0,7)	(0,7)	(0,7)	(0,5)	(0,2)
10 mg der Teilchen	12,9	24,2	33	40,9	52,6	59,7	65,1	68,9	71,7	74
(0,6)	(0,5)	(0,7)	(1,2)	(1,7)	(1,9)	(1,8)	(2,1)	(2,5)	(2,6)	
50 mg der Teilchen	3,5	6,9	10,2	13,1	17,9	22,8	25,8	28,5	31,3	33,5
(0,4)	(0,3)	(0,4)	(0,7)	(0,6)	(0,8)	(0,6)	(0,8)	(0,9)	(1,1)	

Die erhaltenen Daten können verwendet werden, um die in Fig. 3 dargestellten Freisetzungskurven zu zeichnen.

Diese Reihe von Experimenten zeigt, daß die Teilchen aus vernetztem β -CD es in der Tat ermöglichen, die Diffusion eines sehr löslichen Moleküls durch eine semipermeable Membran im Verhältnis zur Menge der Teilchen zu verlangsamen. So hatte nach 6 h die Vergleichsprobe 90% des Propanolols freigesetzt, während die Tests mit 10 mg und anschließend 50 mg der Teilchen 68,9 bzw. 28,5% Propanolol freisetzten.

Beispiel 12

Demonstration einer langsameren Freisetzung des Indikators Méthylénblau, der mit steigenden Gewichtsmengen von Teilchen aus vernetzten β -Cyclodextrinen in Mikrokapseln aus vernetztem Serumalbumin eingekapselt ist

Auf der Basis der obigen Ergebnisse wurde ein neues System für eine langsamere Freisetzung hergestellt. Hier wird die Dialysemembran durch eine semipermeable Membran aus Mikrokapseln aus vernetztem Protein ersetzt. Die Mikro-

DE 199 32 216 A 1

teilchen aus β -CD sind folglich mit dem ausgewählten Indikator Methylenblau eingeschlossen.

Protokoll

1) Herstellung der Vergleichschargen von Mikrokapseln aus vernetztem Serumalbumin

Es wird Humanserumalbumin (HSA) verwendet.

- Herstellung der wäßrigen Phase: 10 mg Methylenblau (FLUKA) werden in 10 ml Acetatpuffer eines pH-Werts von 7,4 gelöst. 1 g HSA wird anschließend in dieser Lösung aufgelöst.
- Emulgieren: Die 10 ml der wäßrigen Phase werden in 50 ml Cyclohexan, das 2% Span 85 enthält, dispergiert. Die Dispersion wird 5 min bei 2000/min gerührt.
- Vernetzen: 60 ml einer 2,5%igen Lösung von Terephthaloylchlorid in Cyclohexan werden zugesetzt. Das Gemisch wird 30 min bei 2000/min verrührt.

Die Mikrokapseln werden anschließend abzentrifugiert und viermal mit Cyclohexan gewaschen. Das Cyclohexan wird durch Verdampfen an einem Rotationsverdampfer entfernt und die Mikrokapseln eingefroren und lyophilisiert.
Ergebnis: Ansehnliche, perfekt runde, blaue Mikrokapseln mit einer dicken Membran und einer Größe von 10 bis 60 μm . Nach Lyophilisieren werden 2 g eines aus intakten Mikrokapseln gebildeten feinen Pulvers erhalten. Dieses Pulver lässt sich perfekt in wäßrigen Medien dispergieren.

2) Herstellung von Chargen aus Mikrokapseln aus vernetztem HSA, die steigende Menge an β -CD-Mikrokapseln enthalten

a) Inkubieren

Eine wechselnde Probe (20 mg, 50 mg oder 100 mg) β -CD Mikroteilchen (hergestellt gemäß Beispiel 9), die lyophilisiert sind, wird in 10 ml einer 0,1%igen Lösung von Methylenblau in Acetatpuffer eines pH-Werts von 7,4 dispergiert. Das Rühren wird 1 h bei Raumtemperatur in Abwesenheit von Licht fortgesetzt.

b) Einkapseln in Mikrokapseln aus vernetztem HSA

- Herstellung der wäßrigen Phase: 1 g HSA wird in 10 ml der obigen Suspension aus β -CD-Teilchen nach einstündiger Inkubation gelöst.
- Emulgieren: Die 10 ml der wäßrigen Phase werden in 50 ml Cyclohexan, das 2% Span 85 enthält, dispergiert. Die Dispersion wird 5 min bei 2000/min verrührt.
- Vernetzen: 60 ml einer 2,5%igen Lösung von Terephthaloylchlorid in Cyclohexan werden zugegeben. Das Gemisch wird 30 min bei 2000/min gerührt.

Die Mikrokapseln werden anschließend abzentrifugiert und viermal mit Cyclohexan gewaschen. Das Cyclohexan wird durch Verdampfen an einem Rotationsverdampfer entfernt und die Mikrokapseln eingefroren und lyophilisiert.

Ergebnis

Ansehnliche, blaue Mikrokapseln werden erhalten. Eine mikroskopische Beobachtung zeigt, daß sie perfekt kugelförmig mit einer dicken Membran und einer Größe von 10 bis 70 μm sind und daß sie die stark durch Methylenblau gefärbten β -CD-Mikroteilchen enthalten. Es hat eine vollständige Einkapselung dieser Mikroteilchen, ungeachtet der Probe (20 mg, 50 mg oder 100 mg β -CD-Mikroteilchen), stattgefunden.
Nach dem Lyophilisieren werden 2 g bis 2,1 g eines feinen, aus intakten Mikrokapseln gebildeten Pulvers erhalten. Dieses Pulver lässt sich perfekt in wäßrigen Medien dispergieren.

3) Herstellung von Chargen aus Mikrokapseln aus vernetztem HSA die 50 mg nicht-vernetztes β -CD enthalten

Für Vergleichszwecke wurden drei Chargen von Mikrokapseln durch Zugabe von 50 mg nicht-vernetztem β -CD anstelle von Teilchen aus vernetztem β -CD zu der Methylenblaulösung hergestellt. Wie oben beschrieben, wird das Rühren 1 h bei Raumtemperatur fortgesetzt. Das Einkapseln, Abtrennen und Trocknen wurde anschließend wie oben beschrieben durchgeführt.

Es ist darauf hinzuweisen, daß der Methylenblau/ β -CD-Komplex bei derselben Wellenlänge wie das freie Methylenblau absorbiert. Des weiteren wurde verifiziert, daß nach einstündiger Inkubation das das Methylenblau und die 50 mg β -CD enthaltende Gemisch die gleiche Extinktion besaß, wie sie ohne Zugabe von β -CD gemessen wurde.

4) Methylenblaufreisetzungstests

Protokoll

Es wurde eine Rührflügelauflösungsgeräte (ERWEKA-Vorrichtung im Einklang mit der Pharmacopoe) verwendet. Sie war auf 37°C thermostatisiert, wobei die Geschwindigkeit der Rührflügel 50/min betrug.

Die gesamte Charge der lyophilisierten Mikroteilchen wird in 500 ml Phosphatpuffer eines pH-Werts von 7,4 disper-

giert. In regelmäßigen Zeitintervallen werden 5-ml-Proben der Suspension entnommen und zentrifugiert. Der Überstand wird durch eine Membran einer Porosität von 0,2 µm filtriert. Die optische Dichte des Filtrats wird bei 668 nm gemessen. Die Mikrokapseln, die im Zentrifugenrohr den Bodensatz bildeten, wurden in 5 ml Phosphatpuffer resuspendiert und in das Freisetzungsmittel wiedereingeführt. Jeder Freisetzungstest (Vergleichstest, Tests mit 20 mg, 50 mg und 100 mg β-CD-Teilchen, Test mit 50 mg nicht-vernetztem β-CD) wurde dreifach durchgeführt.

Ergebnisse

Die Mengen an durch diese unterschiedlichen Chargen von Mikroteilchen nach unterschiedlichen Zeiten freigesetztem Methylenblau, die in % der im Test verwendeten Menge ausgedrückt sind, sind in der folgenden Tabelle angegeben.

% des aus Mikrokapseln aus vernetztem HSA freigesetzten Methylenblaus (Mittelwert (Standardabweichung)) und Wirkung der Zugabe von β-CD-Teilchen und nicht-vernetztem β-CD

	Vergleichsprobe ohne Teilchen	20 mg der Teilchen	50 mg der Teilchen	100 mg der Teilchen	50 mg β-CD
Zeit					
15 min	7,21 (0,22)	5,66 (0,06)	4,36 (0,13)	3,22 (0,19)	8,89 (0,12)
30 min	9,43 (0,14)	7,12 (0,17)	5,23 (0,08)	3,68 (0,24)	11,48 (0,39)
45 min	11,55 (0,17)	8,51 (0,07)	6,14 (0,21)	4,10 (0,31)	13,85 (0,36)
1 h	12,95 (0,25)	9,61 (0,20)	6,80 (0,26)	4,60 (0,48)	15,56 (0,41)
1 h 15 min	14,37 (0,20)	10,55 (0,16)	7,36 (0,05)	4,88 (0,23)	16,61 (0,37)
1 h 30 min	15,15 (0,11)	11,11 (0,53)	7,68 (0,32)	4,98 (0,13)	17,44 (0,35)
2 h	16,11 (0,34)	12,06 (0,13)	8,44 (0,20)	5,28 (0,09)	19,14 (0,44)
2 h 30 min	17,79 (0,12)	12,71 (0,06)	8,57 (0,21)	5,28 (0,09)	20,12 (0,58)
3 h	18,05 (0,12)	12,82 (0,19)	8,79 (0,10)	5,70 (0,19)	20,81 (0,51)
4 h	19,31 (0,19)	13,84 (0,20)	9,23 (0,21)	5,73 (0,37)	21,89 (0,37)
5 h	19,83 (0,09)	14,13 (0,19)	9,37 (0,09)	5,81 (0,20)	22,83 (0,40)
6 h	20,2 (0,38)	14,2 (0,09)	9,57 (0,22)	5,81 (0,13)	23,10 (0,44)
8 h	20,13 (0,43)	14,21 (0,14)	9,79 (0,05)	6,06 (0,28)	23,27 (0,40)

Die erhaltenen Daten können verwendet werden, um die in Fig. 4 dargestellten Freisetzungskurven zu zeichnen. Diese Ergebnisse zeigen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Dialyseuntersuchung von Beispiel 11, daß nach Einkapseln in einer semipermeablen Membran die Teilchen aus vernetztem β-CD in der Tat es ermöglichen, eine langsamere Freisetzung einer wasserlöslichen Substanz zu erreichen. In diesem Fall ist die Verlangsämung abermals proportional zur Menge der eingekapselten β-CD-Teilchen.

Wie erwartet, ermöglicht der Einbau von nicht-vernetztem β-CD keine Verlangsämung der Freisetzung. In der Tat diffundiert der Komplex aufgrund seiner Löslichkeit und seines niedrigen Molekulargewichts frei durch die Membran der Mikrokapseln. Im Gegensatz dazu ist ersichtlich, daß in Gegenwart von nicht-vernetztem β-CD die Freisetzung von Methylenblau rascher ist als bei den Mikrokapseln der ohne Zugabe von β-CD hergestellten Vergleichschargen. Dies wird zweifelsfrei durch die Tatsache erklärt, daß in den Mikrokapseln der Vergleichschargen ein bestimmter Anteil des Indikators an das Protein im Inneren der Mikrokapseln gebunden ist, wodurch die Freisetzung verzögert wird. Wenn β-CD der Methylenblaulösung zugesetzt wird, wird etwas Indikator komplexiert. Dadurch wird der Anteil an Indikator, der an das Protein in den Mikrokapseln zu binden vermag, verringert. Die Freisetzungsr率e ist folglich leider erhöht.

Daraus läßt sich schließen, daß während das nicht-vernetzte β-CD die Diffusion des Indikators nicht verlangsamen kann, ein Unlöslichmachen des β-CDs in Form von Mikroteilchen aus vernetztem β-CD einen entscheidenden Vorteil bringt, indem es ein Verlangsamen der Freisetzungsr率e löslicher Substanzen proportional zur Menge der eingebauten Mikroteilchen ermöglicht.

Beispiel 13

Teilchen aus vernetztem DHA: In-vitro-Tests im Hinblick auf eine Kombination mit Aminosäuren

1) Herstellung von Mikroteilchen aus vernetztem DHA

*Mikroteilchen aus vernetztem DHA werden gemäß Beschreibung in Beispiel 1 hergestellt, mit der Ausnahme, daß die 1 M Natriumhydroxidlösung durch einen Carbonatpuffer eines pH-Werts von 11 ersetzt wird und daß:

- die Rührgeschwindigkeit bei 2000/min gehalten wird (Charge 1)
- die Rührgeschwindigkeit auf 5000/min erhöht wird (Charge 2) oder
- die Rührgeschwindigkeit auf 5000/min erhöht und die DHA-Konzentration auf 5% verringert wird (Charge 3).

2) In-vitro-Test im Hinblick auf eine Kombination mit Aminosäuren

Prinzip der Tests

5 Es wurde beobachtet, daß sich Mikrokapseln aus vernetztem DHA nach und nach in Gemischen, die einerseits verdünnte Dinatriumcarbonatlösung (beispielsweise 1%) und andererseits ein Polyethylenglykol, beispielsweise PEG 200, enthalten, auflösen können. Das Verfahren umfaßt eine Alkoholyse der Esterbindungen, die in den Teilchen vorhanden sind, unter Freisetzung des DHA. Dieses kann dann mit Aminosäuren unter Bildung einer charakteristischen braunen Färbung reagieren.

10 Wir haben die Intensität der Färbungen, die in Gegenwart von Glycin unter Verwendung von unter den oben definierten Bedingungen hergestellten Mikroteilchen erhalten wurden, mit der Intensität, die unter Verwendung von nicht-vernetztem DHA erreicht wurde, durch Ablesen der optischen Dichte bei 420 nm nach 48 h verglichen.

Testprotokoll

15 * Herstellung des experimentellen Röhrchens aus Mikroteilchen T1:
20 mg lyophilisierte Teilchen werden in 4 ml eines Gemisches aus 90% v/v PEG 200 und 10% v/v 1% Dinatriumcarbonatlösung eingebracht.
100 µl einer 0,66-M-Glyciniösung werden zugegeben, worauf das Röhrchen in ein bei 32°C thermostatisiertes Bad eingebracht wird. Nach 48 h wird das Gemisch mit destilliertem Wasser auf 1/4 verdünnt und die optische Dichte gemessen.

20 * Herstellung eines Röhrchens aus Mikroteilchen ohne Glycin T2:
Das Vorgehen entspricht dem für das Röhrchen T1, mit der Ausnahme, daß 100 µl destilliertes Wasser anstelle der Glyciniösung zugegeben wurden.

25 * Herstellung eines Vergleichsröhrchens aus nicht-vernetztem DHA mit Glycin T3:
Das Vorgehen entspricht demjenigen für das Röhrchen T1, mit der Ausnahme, daß die Mikroteilchen durch 20 mg DHA ersetzt werden.

30 * Herstellung des Vergleichsröhrchens aus nicht-vernetztem DHA ohne Glycin T4:
Das Vorgehen entspricht demjenigen für das Röhrchen T2, mit der Ausnahme, daß die Mikroteilchen durch 20 mg DHA ersetzt werden.

Ergebnisse

Diese sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

35 In-vitro-Tests bezüglich der Kombination von Teilchen aus vernetztem DHA mit Glycin: Farbe, Messung der optischen Dichte nach 48 h, Vergleich mit freiem DHA

40	Mit Glycin		Ohne Glycin	
	Farbe	Optische Dichte nach 48 h	Farbe	Optische Dichte nach 48 h
45 Nicht-vernetzte DHA-Vergleichsproben				
30 min: blaßgelb			30 min: blaßgelb	
2 h: braun				
50 48 h: schwarzbraun		1,169	48 h: gelb	0,154
Mikroteilchen, Charge 1				
1 h 30 min: brauner Glanz			2 h: farblos	
55 48 h: orange-braun		0,494	48 h: hellgelb	0,056
Mikroteilchen, Charge 2				
1 h: brauner Glanz			24 h: gelber Glanz	
60 48 h: orange-braun		0,616	48 h: gelber Glanz	0,025
Mikroteilchen, Charge 3				
30 min: brauner Glanz			24 h: gelber Glanz	
65 48 h: braun		0,756	48 h: hellgelb	0,081

Obwohl eine hellere Färbung als bei freiem DHA erreicht wird, bedingen die Mikroteilchen ein Auftreten einer braunen Färbung nach 48 h in Anwesenheit von Glycin. Dies zeigt, daß diese Teilchen DHA freizusetzen vermögen, das sich

DE 199 32 216 A 1

seinerseits mit Aminosäuren vereinigen kann. Die Mikrokapseln der Chargen 2 und 3, die mit einer höheren Rührgeschwindigkeit hergestellt wurden und folglich kleiner sind, liefern die dunkelsten Färbungen. Die intensivste Färbung wird mit den mit 5% DHA hergestellten Teilchen (Charge 3) erreicht.

Beispiel 14

Teilchen aus vernetztem DHA: Bräunungseffekt auf einer rekonstruierten Haut

Die gemäß Beschreibung in Beispiel 13 für die Charge Nr. 3 hergestellten DHA-Mikrokugeln wurden lyophilisiert und mit 25 kgray β -Strahlen sterilisiert. Anschließend wurden sie in einer Konzentration von 2,5% in einem sterilen Medium suspendiert. Sterile Lösungen, die DHA-Konzentrationen zwischen 0 und 5% enthielten, wurden auch hergestellt.

Diese beiden Zubereitungen wurden anschließend auf rekonstruierte Haut aus auf die Oberfläche einer bzw. in eine durch Lyophilisieren eines Collagengels (Coletica) hergestellte(n) extrazelluläre(n) Matrix auf- bzw. eingeimpften Keratinocyten und normalen Fibroblasten appliziert. Diese rekonstruierte Haut kann zur Simulierung einer Applikation auf ein Versuchstier oder eine Versuchsperson verwendet werden.

Nach Applikation einer jeden der Testzubereitungen ($10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$) auf die Oberfläche dieser rekonstruierten Haut wird die Bewertung des Aussehens der braunen Farbe, die für die Reaktion von DHA mit Aminosäuren charakteristisch ist, verfolgt und mit der einer jeden der Proben des Vergleichsbereichs verglichen.

Nach 8, 24, 48 und 96 h Inkubation bei 37°C unter einem üblicherweise in Zellkulturen verwendeten Gasgemisch aus CO_2/O_2 wurde diese Farbe untersucht und bewertet.

Zuerst ist ersichtlich, daß die Färbung mit der Inkubationszeit zunimmt und daß sie ferner mit der Menge an auf die rekonstruierte Haut appliziertem DHA zunimmt. Des weiteren ist nach 96-stündiger Inkubation ersichtlich, daß die in einer Konzentration von 2,5% in Suspension in einem sterilen Medium verwendeten DHA-Mikrokugeln systematisch eine Färbung der rekonstruierten Haut in derselben Intensität wie bei einer 5%igen DHA-Lösung ermöglichen. Bei einer identischen Konzentration ist die Färbungsaktivität, die mit den DIIA-Mikrokugeln erreicht wird, folglich doppelt so intensiv wie die, die mit DHA, das in freier Form verwendet wird, erreicht wird. Dies läßt sich dadurch erklären, daß das DHA verfügbarer ist, wenn es in Form von Mikrokugeln verwendet wird. Die länger anhaltende Freisetzung oder der Verzögerungseffekt, der mit den DHA-Mikrokugeln erreicht wird, liefert folglich eine Erklärung für die beobachteten Unterschiede im DHA-Verhalten.

Diese Verzögerungswirkungen ermöglichen es in einem breiteren Maße, die Verwendung von aktiven Bestandteilen, die reizen, toxisch sind, eine geringe Bioverfügbarkeit besitzen oder in Hautgewebe sehr rasch eindringen, in diesen Formen von Mikrokugeln oder Nanokugeln, in kosmetischen, pharmazeutischen oder Agronahrungsmittelanwendungen ins Auge zu fassen.

Beispiel 15

Verwendung der erfindungsgemäßen Produkte in kosmetischen oder pharmazeutischen Rezepturen vom Öl-in-Wasser-Emulsionstyp

Rezeptur 15a

A	Entmineralisiertes Wasser	ausreichend auf 100
	Butylenglykol	2
	Glycerin	3
	Natriumdihydroxyethylphosphat, Isopropyl-hydroxycetylether	2
B	Glycerinstearat SE	14
	Trisononanoin	5
	Octylcocoat	6
C	Butylenglykol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben	2
	Der pH-Wert wird auf 5,5 eingestellt	
D	Erfindungsgemäße Produkte	0,01-10%

DE 199 32 216 A 1

Rezeptur 15b

A	Wasser	ausreichend auf 100
5	Butylenglykol	2
	Glycerin	3
10	Polyacrylamid, Isoparaffin, Heptaethylen- glykollaurylether (Laureth-7)	2,8

B	Butylenglykol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben	2
15	Phenoxyethanol, Methylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Ethylparaben	2
20	Butylenglykol	0,5

C	Erfindungsgemäße Produkte	0,01-10%
---	---------------------------	----------

Rezeptur 15c

A	Carboxyvinylpolymer (Carbomer)	0,50	
30	Propylenglykol	3	
	Glycerin	5	
35	Entmineralisiertes Wasser	ausreichend auf 100	
B	Octylcocoat	5	
40	Bisabolol	0,30	
	Dimethicon	0,30	
C	Natriumhydroxid	1,60	
45			
D	Phenoxyethanol, Methylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Ethylparaben	0,50	
50			
E	Duftstoff	0,3	
55	F	Erfindungsgemäße Produkte	0,01-10%

DE 199 32 216 A 1

Beispiel 16 gemäß der vorliegenden Erfindung: Verwendung der erfindungsgemäßen Produkte in einer Rezeptur vom Wasser-in-Öl-Typ

A	PEG 30 -Dipolyhydroxystearat	3	5
	Caprinsäuretriglyceride	3	
	Cetearyloctanoat	4	
	Dibutyladipat	3	
	Weintraubenkernöl	1,5	10
	Jojobaöl	1,5	
	Phenoxyethanol, Methylparaben, Propylparaben,		
	Butylparaben, Ethylparaben	0,5	15
B	Glycerin	3	
	Butylenglykol	3	20
	Magnesiumsulfat	0,5	
	EDTA	0,05	
	Entmineralisiertes Wasser	ausreichend auf 100	25
C	Cyclomethicon	1	
	Dimethicon	1	30
D	Duftstoff	0,3	35
E	Erfindungsgemäßes Produkt	0,01-10%	

Beispiel 17 gemäß der vorliegenden Erfindung: Verwendung der erfindungsgemäßen Produkte in einer Rezeptur vom Shampoo- oder Duschgeltyp

A	Xanthangummi	0,8	40
	Entmineralisiertes Wasser	ausreichend auf 100	45
B	Butylenglykol, Methylparaben, Ethylparaben,		
	Propylparaben	0,5	50
	Phenoxyethanol, Methylparaben, Propylparaben,		
	Butylparaben, Ethylparaben	0,5	55
C	Citronensäure	0,8	
D	Natriumlaurylsulfat	40,0	60
E	Erfindungsgemäßes Produkt	0,01-10%	65

DE 199 32 216 A 1

Beispiel 18 gemäß der vorliegenden Erfindung: Verwendung der erfindungsgemäßen Produkte in einer Rezeptur von einem Typ, der Lippenstifte und andere wasserfreie Produkte umfaßt

5	A	Mineralwachs	17,0
10		Isostearylisostearat	31,5
15		Propylenglykoldipelargonat	2,6
20		Propylenglykolisostearat	1,7
25		PEG-8-Bienenwachs	3,0
30		Palm- und Palmkernöl	3,4
35		Lanolinöl	3,4
40	B	Sesamöl	1,7
45		Tribehenin	1,7
50		Cetylactat	1,7
55		Mineralöl, Lanolinalkohol	3,0
60	B	Rizinusöl	ausreichend auf 100
65		Pigmente (insgesamt)	3,9
70		(Titandioxid, Rouge Covonor W360A® (Wackherr), Bromo de Phloxine 27® (Wackherr) Rouge Covalac W 1510® (Wackherr), Eisenoxide)	
75	C	Erfindungsgemäßes Produkt	0,01-5

Beispiel 19 gemäß der vorliegenden Erfindung: Verwendung der erfindungsgemäßen Produkte in einer wässrigen Gelrezeptur (Augenkonturgele, schlankmachende Gele usw.)

40	A	Entmineralisiertes Wasser	ausreichend auf 100
45		Carboxyvinylpolymer (Carbomer)	0,5
50		Butylenglykol	15
55		Phenoxyethanol, Methylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Ethylparaben	0,5
60	B	Erfindungsgemäßes Produkt	0,01-10

Beispiel 20

Mit den erfindungsgemäßen Produkten durchgeführte toxikologische Untersuchungen

a) Orale Toxizität

60 Das verwendete Testprotokoll stand im Einklang mit der OECD-Richtlinie betreffend eine Untersuchung der akuten oralen Toxizität (Nr. 401 vom 24. Februar 1987) in Maximaldosen von 5 g/kg Körpergewicht. Die Tests führten zu keinen makroskopischen Läsionen, die einer toxischen Wirkung des Produkts zuzuschreiben wären.
Bei oraler Verwendung in einer Dosis unter 5 g/kg besitzen die erfindungsgemäßen Produkte (Beispiel 1) folglich eine Toxizität von 0.

b) Augenreizung

Die Tests erfolgten gemäß dem offiziellen Verfahren gemäß dem Beschuß vom 3. Mai 1990 (Journal Officiel de la Ré-

DE 199 32 216 A 1

publique Francaise vom 14. November 1990) mit den erfindungsgemäßen Produkten (Beispiel 1). Es traten keine Läsionen der Iris oder Hornhaut auf.

Die rein eingeträufelten erfindungsgemäßen Produkte (Beispiel 1) erschienen nicht reizend zu sein, so daß die Augentoleranz als sehr gut angesehen werden kann.

c) Hautreizung

Die Tests erfolgten gemäß dem offiziellen Verfahren gemäß dem Beschuß vom 1. Februar 1982 (Journal Officiel de la République Francaise vom 21. Februar 1982) mit den erfindungsgemäßen Produkten (Beispiel 1). Es traten keine Reizungssphänomene auf.

Die rein applizierten erfindungsgemäßen Produkte (Beispiel 1) erschienen nicht reizend zu sein, so daß die Hauttoleranz als ausgezeichnet angesehen werden kann.

Patentansprüche

1. Teilchen, die mindestens auf der Oberfläche eine Wand aufweisen, die aus einem oder mehreren Monosacchariden oder Oligosacchariden gebildet ist, die durch Grenzflächenvernetzung in Emulsion vorzugsweise bei Raumtemperatur zwischen (einem) Monosaccharid(en) oder Oligosaccharid(en) mit mindestens einer primären Alkoholgruppe und einem polyfunktionellen acylierenden Vernetzungsmittel, vorzugsweise einem Disäurehalogenid und insbesondere einem Disäurechlorid unter Bildung von Esterbindungen zwischen der (den) acylierbaren Hydroxylgruppe(n) des (der) primären Alkohols (Alkohole) des Monosaccharids oder Oligosaccharids und den Acylgruppen des polyfunktionellen Acylierungsmittels vernetzt sind. 15
2. Teilchen nach Anspruch 1, wobei die oben genannten Monosaccharide oder Oligosaccharide ein Molekulargewicht unter 5000 Dalton aufweisen und mindestens eine primäre Alkoholgruppe tragen. 20
3. Teilchen nach Anspruch 1 oder 2, wobei das oben genannte Monosaccharid oder Oligosaccharid in Form von Dicarboxaten, beispielsweise als mindestens eine Verbindung vorhanden ist, die aus Polyolen, die von der Hydrierung der Aldehyd- oder Ketogruppen von Osen herführen, von Aldosen abgeleiteten Aldonsäuren und entsprechenden Lactonen, Phosphorsäureestern von Osen, Osaminen oder Heterosiden, deren Osideneinheit aus einer oder mehreren Osen besteht und die mindestens eine primäre Alkoholgruppe enthält, ausgewählt ist. 25
4. Teilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, hergestellt aus einem einzelnen, ein niedriges Molekulargewicht aufweisenden Monosaccharid oder Oligosaccharid oder aus Gemischen. 30
5. Teilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die oben genannten Monosaccharide aus Ketosen, Aldosen, Polyolen, Aminozuckern oder Osaminen oder Aldonsäuren und entsprechenden Lactonen ausgewählt sind. 35
6. Teilchen nach Anspruch 5, wobei die oben genannten Ketosen aus Dihydroxyacetone, Erythritose, Ribulose, Xylulose, Fructose, Sorbose und Derivaten hiervon ausgewählt sind; die oben genannten Aldosen aus Erythrose, Threose, Xylose, Arabinose, Ribose, Desoxyribose, Glucose, Mannose und Galactose ausgewählt sind; die oben genannten Polyole aus Sorbit, Mannit, Xylit, Arabit, Dulcitol oder Galactitol, Erythrit und Threitol ausgewählt sind; die Aminozucker oder Osamine aus Glucosamin, Galactosamin, Glucosaminulfat und Galactosaminulfat ausgewählt sind; die Aldonsäuren aus Gluconsäure und Galactonsäure ausgewählt sind und die Lactone aus Gluconolactonen und Galactonolactonen ausgewählt sind. 40
7. Teilchen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das oben genannte Oligosaccharid aus einem Disaccharid, wie Saccharose, Lactose, Maltose, Cellobiose, Trehalose, Melibiose oder Raffinose, einem Dextrin oder Produkt der teilweisen Hydrolyse von Stärke oder vorzugsweise einem Cyclodextrin, wie alpha-Cyclodextrin, beta-Cyclodextrin oder gamma-Cyclodextrin, Cyclodextrinderivaten, wie Hydroxyethyl- β -cyclodextrin oder Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (2-HP- β -CD, 3-HP- β -Cyclodextrin, 2,3-HP- β -Cyclodextrin), verzweigten Cyclodextrinen, wie Glucosyl- β -cyclodextrin, Diglucosyl- β -cyclodextrin, Maltosyl- β -cyclodextrin oder Dimaltosyl- β -cyclodextrin, oder Gemischen aus Oligosacchariden ausgewählt ist und das von dem Oligosaccharid abgeleitete Polysaccharid aus Lactit, Maltit und kommerziellen Zubereitungen, die Polysaccharide enthalten, die durch Hydrieren von Produkten der teilweisen Hydrolyse von Stärke erhalten wurden, ausgewählt ist. 45
8. Teilchen nach einem der Ansprüche 3 bis 7, wobei das Heterosid eine Osideneinheit, die eine oder mehrere Osideneinheiten und mindestens eine primäre Alkoholgruppe enthält, und eine Nichtosid- oder Aglykoneinheit mit vorzugsweise einer cyclischen Struktur, die einen oder mehrere aromatische oder nicht-aromatische Ringe umfaßt, die ein oder mehrere Heteroatome, wie Stickstoff-, Sauerstoff- oder Schwefelatome umfassen können, umfaßt, wobei das Heterosid vorzugsweise aus β -D-Xylosiden, wie 4'-Methylumbelliferyl- β -D-Xylosid und para-Nitrophenyl- β -D-xylosid, Riboflavin, natürlichen Nucleosiden aus Ribonucleosiden, wie Guanosin, Adenosin, Uridin und Cytidin, oder Desoxyribonucleosiden, wie Desoxyguanosin, Desoxyadenosin, Desoxycytidin und Thymidin, synthetischen antiviralen oder Antikrebsnucleosiden, Strukturanalogen natürlicher Nucleoside, wie Adenosinanalogen und Desoxycytidinanalogen, Mononucleotiden, Desoxymononucleotiden, Oligonucleotiden, Desoxyoligonucleotiden, Antibiotika der Aminoglykosidgruppe, wie Streptomycin, Dihydrostreptomycin, Kanamycin, Amikacin, Dibekacin, Tobramycin, Neomycin und Paromomycin, Saponosiden mit steroidalem Aglycon, wie Saponosiden von Efeu, Saponosiden mit Triterpenaglycon, wie das Saponosid von der Panamarinde oder kardiotonischen Heterosiden mit steroidalem Aglycon, wie Digitoxin, ausgewählt ist. 55
9. Teilchen nach einem der vorhergehenden Ansprüche bei denen es sich um Mikroteilchen, insbesondere Mikrokapseln oder Mikrokugeln, handelt. 60
10. Teilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 8, bei denen es sich um Nanoteilchen, insbesondere Nanokapseln oder Nanokugeln, handelt. 65
11. Teilchen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, die mindestens auf der Oberfläche eine Wand umfassen, die aus Cyclodextrinen, insbesondere vernetzten β -Cyclodextrinen, gebildet ist.

DE 199 32 216 A 1

12. Cyclodextrinteilchen nach Anspruch 11, die mit einer aktiven Substanz, insbesondere einer kosmetischen Substanz, einer pharmazeutischen Substanz, einer diätetischen Substanz, einer Agronahrungsmittelsubstanz oder einer Agroindustriesubstanz beladen sind.

13. Cyclodextrin teilchen nach Anspruch 11 oder 12, die in größeren biokompatiblen und bioabbaubaren Teilchen, beispielsweise Teilchen aus vernetzten Proteinen oder covernetzten Proteinen und Polysacchariden unter Bildung doppelter Teilchen, die ein für eine langsame Freisetzung sorgendes System bilden, eingeschlossen sind.

14. Teilchen nach Anspruch 13, wobei das oben genannte Protein aus tierischen Proteinen, wie Collagen, Atelocollagen, Gelatine, Serumalbumin, Ovalbumin, Hämoglobin, Milchproteinen einschließlich Casein und Molkenproteinen, Lactalbumin, Globulinen und Fibrinogen und pflanzlichen Proteinen, die insbesondere aus Leguminosen und speziell aus den folgenden Pflanzen: Sojabohnen Lupinen, Erbsen, Kichererben, Luzerne, Pferdebohnen, Linsen, Gartenbohnen, Raps und Sonnenblumen oder aus Getreidesorten, wie Weizen, Mais, Gerste, Malz, Hafer und Roggen, extrahiert sind, ausgewählt ist und das oben genannte Polysaccharid aus Glykosaminoglykanen, in vorteilhafter Weise einschließlich Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat und Keratansulfat, sowie Heparin und Derivaten hiervon, insbesondere niedrigmolekularem Heparin mit einem Molekulargewicht zwischen etwa 2000 und 10.000 und kosmetisch oder pharmazeutisch akzeptablen Heparinsalzen, wie den Natrium- und Kaliumsalzen, natürlichen Gummis, Carrageenen, Glucomannanen, Galactomannanen, Amylose oder Amylopektin oder Gemischen hiervon und hydroxyalkylierten Polysaccharidderivaten, wie Hydroxyethylstärke oder Hydroxyethylcellulose, ausgewählt ist.

15. Teilchen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das oben genannte Monosaccharid Dihydroxyaceton ist.

16. Verwendung der Teilchen gemäß Definition in einem der Ansprüche 1 bis 15 als kosmetisches Mittel oder zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung oder einer Nahrungsmittelzusammensetzung, wobei die Teilchen den optionalen Einbau von wasserlöslichen oder lipidlöslichen Substanzen in Form einer Lösung, Suspension oder Emulsion erlauben.

17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei die Zusammensetzung 0,1 bis 20 Gew.-% der Teilchen, bezogen auf das Endgewicht der Zusammensetzung und vorzugsweise zwischen 0,1 und 5 Gew.-%, bezogen auf das Endgewicht der Zusammensetzung umfaßt.

18. Verfahren zur Herstellung von Teilchen kleiner Abmessungen, die mindestens auf der Oberfläche eine Wand umfassen, die aus einem oder mehreren vernetzten Monosacchariden oder Oligosacchariden gebildet ist, wobei das Verfahren die folgenden Stufen umfaßt:

- Herstellen einer wässrigen Phase bei einem pH-Wert zwischen 10,5 und etwa 14, worin mindestens ein Monosaccharid oder mindestens ein Oligosaccharid gelöst ist;
- Herstellen einer hydrophoben Phase, die im wesentlichen mit Wasser nicht mischbar ist und die gegebenenfalls ein grenzflächenaktives Mittel enthält;
- Dispergieren der wässrigen Phase in der hydrophoben Phase durch Rühren zur Herstellung einer Emulsion vom Wasser-in-Öl-Typ;
- Zugeben einer Lösung eines polyfunktionellen Acylierungsmittels zu der Emulsion, wobei das Rühren eine ausreichende Zeitdauer aufrechterhalten wird, um das Monosaccharid oder Oligosaccharid an der Grenzfläche der dispergierten Tröpfchen der Emulsion zu vernetzen und um dadurch Teilchen herzustellen; und
- gegebenenfalls Abtrennen der Teilchen aus dem Reaktionsmedium.

19. Verfahren zur Herstellung von Teilchen kleiner Abmessungen, die mindestens auf der Oberfläche eine Wand umfassen, die aus einem oder mehreren vernetzten Monosacchariden oder Oligosacchariden gebildet ist, wobei das Verfahren die folgenden Stufen umfaßt:

- Herstellen einer wässrigen Phase bei einem pH-Wert zwischen 10,5 und etwa 14, worin mindestens ein Monosaccharid oder mindestens ein Oligosaccharid gelöst ist;
- Herstellen einer hydrophoben Phase, die im wesentlichen mit Wasser nicht mischbar ist und die ein polyfunktionelles acylierendes Vernetzungsmittel enthält;
- Dispergieren der hydrophoben Phase in der wässrigen Phase durch Rühren unter Bildung einer Emulsion vom Öl-in-Wasser-Typ, wobei das Rühren während einer ausreichenden Zeitdauer aufrechterhalten wird, um das Monosaccharid oder Oligosaccharid an der Grenzfläche der dispergierten Tröpfchen der Emulsion zu vernetzen und um dadurch Teilchen, insbesondere Kapseln, herzustellen; und
- gegebenenfalls Abtrennen der Teilchen aus dem Reaktionsmedium.

20. Verfahren zur Herstellung von Teilchen aus vernetzten Cyclodextrinen kleiner Abmessungen, die in größeren Teilchen eingeschlossen sind, wobei das Verfahren die folgenden Stufen umfaßt:

- Zuerst werden Teilchen aus vernetzten Cyclodextrinen gemäß der vorliegenden Erfindung in einem Emulsionssystem vom Wasser-in-Öl-Typ hergestellt und gewonnen;
- diese Teilchen werden anschließend in eine wässrige Lösung eines aktiven Wirkstoffs bei einem pH-Wert zwischen etwa 4,5 und etwa 8 während einer ausreichenden Zeit eingebracht oder darin inkubiert, um einen Einstrom des aktiven Wirkstoffs in den Teilchen zu gewährleisten;
- anschließend wird ein Protein oder ein Protein/Polysaccharid-Gemisch in der Suspension der Teilchen gelöst;
- danach wird das Gemisch durch Rühren in einer hydrophoben Phase dispergiert, um eine Emulsion vom Wasser-in-Öl-Typ herzustellen;
- danach wird eine Lösung eines polyfunktionellen Acylierungsmittels zu der Emulsion zugegeben, wobei das Rühren während einer ausreichenden Zeitdauer beibehalten wird, so daß sich größere Teilchen um die Teilchen aus den vernetzten Cyclodextrinen gemäß der vorliegenden Erfindung durch Acylierung der acylierbaren funktionellen Gruppen des Proteins oder Protein/Polysaccharid-Gemisches bilden; und
- danach werden gegebenenfalls die erhaltenen größeren Teilchen, die die intakten Teilchen aus vernetzten

DE 199 32 216 A 1

Cyclodextrinen gemäß der vorliegenden Erfindung und den aktiven Wirkstoff enthalten, der teilweise durch die Cyclodextrine der Teilchen der vernetzten Cyclodextrine komplexiert ist, abgetrennt.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, wobei die wäßrige Lösung aus einem Puffer, beispielsweise einem Carbonat- oder Phosphatpuffer, der auf einen pH-Wert oberhalb von 10,5, beispielsweise einen pH-Wert von etwa 11, eingestellt ist oder einer Lösung eines alkalischen Mittels, wie Natriumhydroxid, beispielsweise einer 1 M Natriumhydroxidlösung, besteht. 5

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 21, wobei die Konzentration des oben genannten Monosaccharids oder Oligosaccharids in der wäßrigen Phase zwischen 3 und 80, vorzugsweise zwischen 10 und 30 Gew.-%, liegt. 10

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 22, wobei das oben genannte polyfunktionelle acylierende Vernetzungsmittel aus mindestens einem Säuredihalogenid, das vorzugsweise aus Phthaloyl-, Terephthaloyl-, Sebacyl-, Glutaryl-, Adipoyl- und Succinylhalogeniden ausgewählt ist, oder einem Säureanhydrid besteht. 15

24. Verfahren zur kosmetischen Behandlung durch Applikation einer kosmetisch wirksamen Menge von Teilchen gemäß Definition in einem der Ansprüche 1 bis 15, die mindestens auf der Oberfläche eine Wand umfassen, die aus einem oder mehreren Monosacchariden oder Oligosacchariden gebildet ist, die speziell durch Grenzflächenvernetzung in Emulsion, vorzugsweise bei Raumtemperatur, zwischen (einem) Monosaccharid(en) oder Oligosaccharid(en) mit mindestens einer primären Alkoholgruppe und einem polyfunktionellen acylierenden Vernetzungsmittel, vorzugsweise einem Disäurehalogenid oder insbesondere einem Disäurechlorid unter Bildung von Esterbindungen zwischen der (den) acylierbaren Hydroxylgruppe(n) des (der) primären Alkohols (Alkohole) des Monosaccharids oder Oligosaccharids und den Acylgruppen des polyfunktionellen Acylierungsmittels vernetzt sind, auf eine geeignete Stelle eines Säugetiers, vorzugsweise eines Menschen. 20

25. Verwendung der Teilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die ein für eine langsame Freisetzung sorgendes System darstellt und die auf einem beliebigen Verreichungsweg, beispielsweise dem oralen, parenteralen, rektalen, vaginalen, pulmonalen, kutanen, ophthalmischen oder nasalen Weg verabreicht werden kann. 25

26. Verwendung der Teilchen nach Anspruch 8 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, wobei die Teilchen mindestens auf der Oberfläche eine Wand umfassen, die aus einem oder mehreren vernetzten Heterosiden gebildet ist, wobei sich die Teilchen als teilchenförmige Prodrugs oder Vorläufer des (der) aktiven Heterosids (Heteroside) verhalten und den aktiven Wirkstoff in vivo unter der Einwirkung von Enzymen, beispielsweise Esterasen, freizusetzen vermögen, wobei die Teilchen auf einem beliebigen Verreichungsweg verabreicht werden können und einen Schutz des aktiven Wirkstoffs, eine langsame Freisetzung, eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit, eine Verbesserung der Haut- oder Schleimhauttoleranz, eine zielgerichtete Ansteuerung eines Organs, Gewebes oder Gefäßbereichs oder im Falle von Nanopartikeln eine Passage des aktiven Wirkstoffs in die Targetzellen für eine Antibiotikum-, Antivirus- oder Antikrebstherapie oder für einen Transfer von genetischem Material in Zellen gewährleisten. 30

35

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -



FIG.1

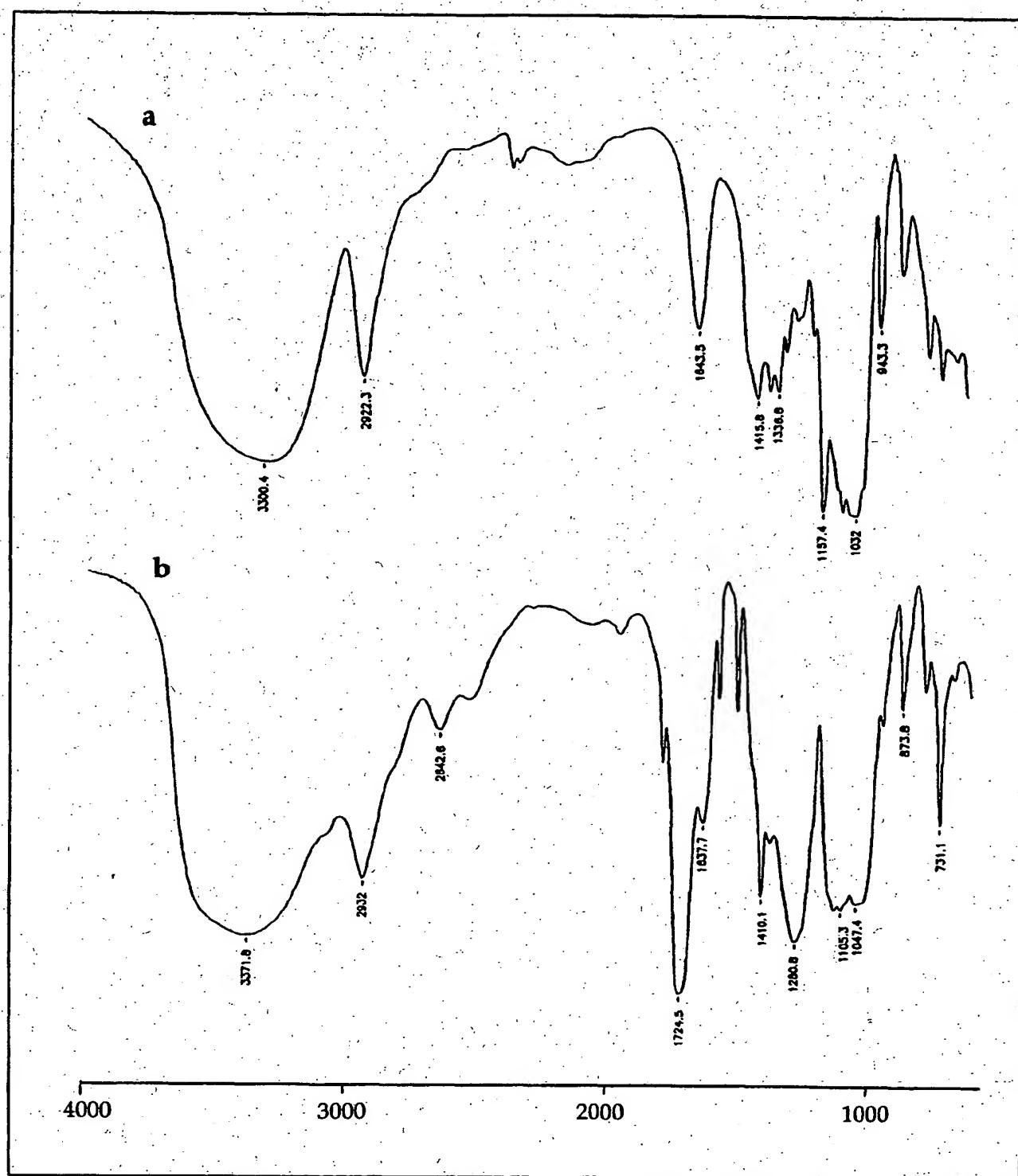


FIG. 2

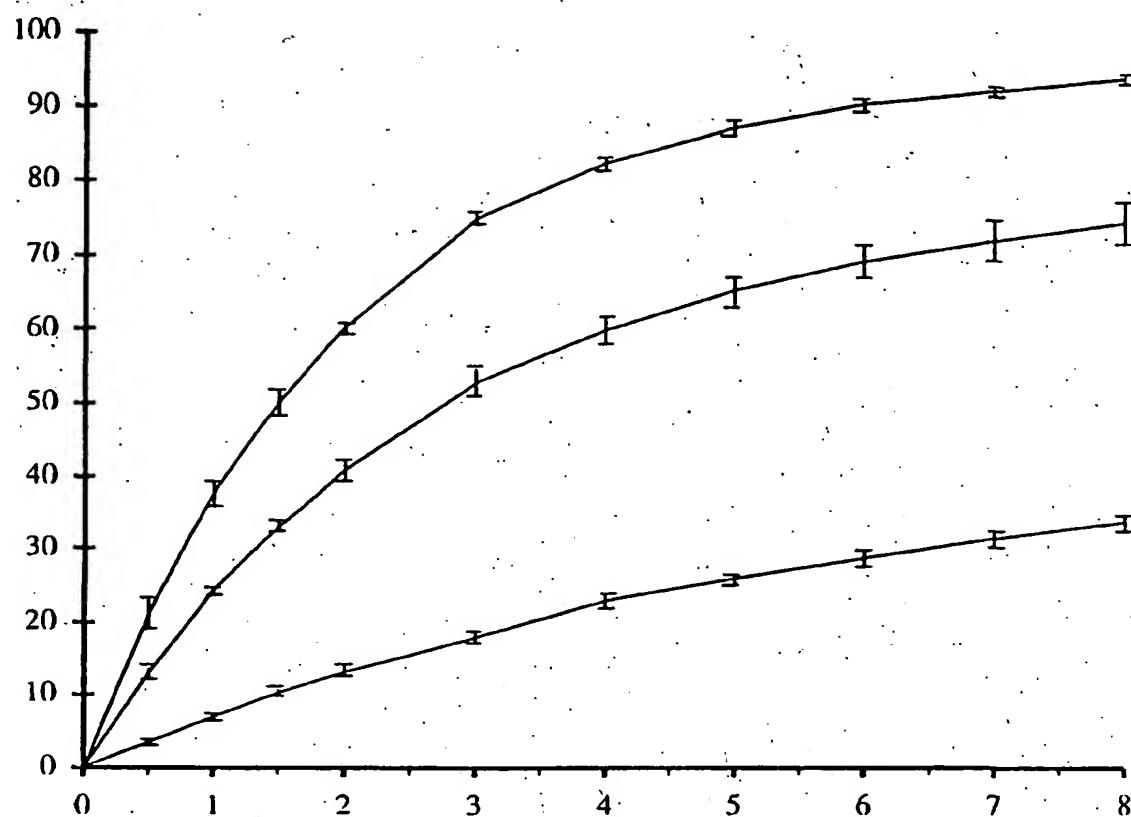


FIG. 3

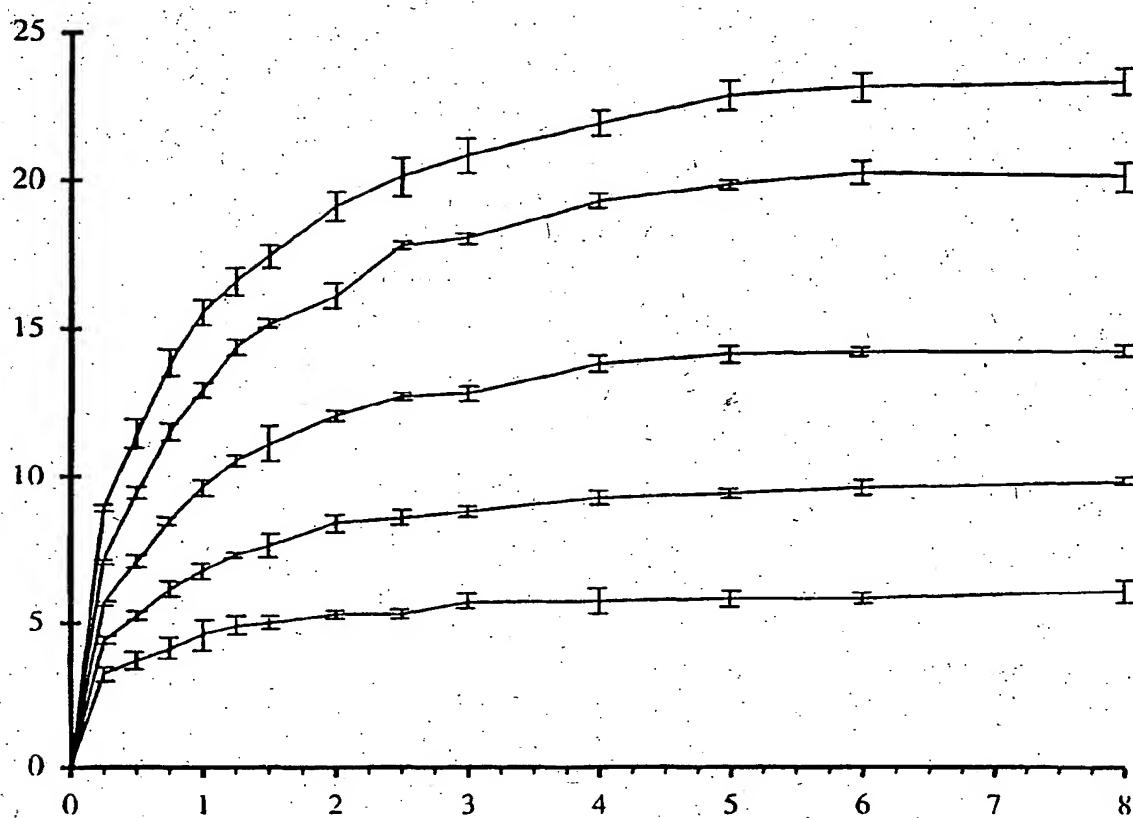


FIG.4